



# Prévalence de pathogènes humains dans les sols français, effet des facteurs pédoclimatiques, biologiques et du mode d'utilisation des sols

Aude Locatelli

## ► To cite this version:

Aude Locatelli. Prévalence de pathogènes humains dans les sols français, effet des facteurs pédoclimatiques, biologiques et du mode d'utilisation des sols. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOS081 . tel-01128771

**HAL Id: tel-01128771**

**<https://theses.hal.science/tel-01128771>**

Submitted on 10 Mar 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**A D E M E**



UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

École Doctorale Environnements-Santé

## THÈSE

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE**

en Sciences de la Vie

Spécialité : **Écologie Microbienne**

présentée par

**Aude Locatelli**

Thèse dirigée par

**Alain Hartmann et Pascal Piveteau**



# Prévalence de pathogènes humains dans les sols français, effet des facteurs pédoclimatiques, biologiques et du mode d'utilisation des sols.

Préparée au sein de

**L'Unité Mixte de Recherche Agroécologie à l'INRA de Dijon dans le pôle  
Microbiologie Environnementale et Risque Sanitaire (MERS)**

Thèse soutenue le 7 octobre 2013, devant le jury composé de :



**Loïc BOLLACHE**

Professeur, Université de Bourgogne, Dijon

**Edward TOPP**

Directeur de Recherche, Agriculture Agrifood Canada, London,  
Canada

**Benoît COURNOYER**

Directeur de Recherche, CNRS – Université Claude Bernard Lyon  
1, Lyon

**Isabelle FEIX**

Ingénieur, ADEME, Angers

**Sylvie NAZARET**

Chargée de Recherche, CNRS – Université Claude Bernard Lyon  
1, Lyon

**Anne-Marie POURCHER**

Directeur de Recherche, IRSTEA, Rennes

**Alain HARTMANN**

Directeur de Recherche, INRA, Dijon

**Pascal PIVETEAU**

Maître de Conférences, Université de Bourgogne, Dijon

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

## REMERCIEMENTS

**Pour débiter ce manuscrit et pour clôturer mon long séjour à l'INRA je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai interagi durant ma thèse :**

Je tiens tout d'abord à remercier l'ADEME et l'INRA (département Environnement Agronomie) d'avoir financé ce projet de thèse.

Je souhaite remercier *Philippe Lemanceau*, directeur de l'UMR 1347 Agroécologie de m'avoir accueillie au sein de l'INRA.

**Je suis particulièrement reconnaissante envers mes 2 encadrants :**

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, *Alain Hartmann*, de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse, de m'avoir fait confiance et finalement, de m'avoir encadrée durant toutes ces années.

Un grand merci également à mon co-encadrant de thèse, *Pascal Piveteau*, que j'ai beaucoup sollicité tout au long de cette thèse pour discuter de mes procédures expérimentales et de mes résultats. Merci d'avoir participé à la valorisation et à la publication de mes travaux.

**Je remercie tous les membres de mon jury de thèse :**

Je pense à mes 2 rapporteurs, *Benoit Cournoyer* et *Edward Topp*, qui ont eu la lourde tâche de lire mon manuscrit de thèse, merci à vous.

Je remercie spécialement *Isabelle Feix* et *Sylvie Nazaret* de m'avoir suivie durant toute ma thèse en participant à mes comités de pilotage et d'avoir évalué mon travail lors de ma soutenance en temps d'examinateur.

Je remercie également *Anne-Marie Pourcher* qui a accepté d'être examinateur de ma soutenance.

Un grand merci à *Loïc Bollache*, président du jury qui a animé ma soutenance avec décontraction.

**J'ai été particulièrement bien entourée dans mon environnement de travail et je tiens à rendre un petit hommage à toutes les personnes qui m'ont côtoyée de près ou de loin :**

Au sein de mon équipe :

*Laurent Gal* qui est la preuve vivante que l'on peut porter des chemises à motifs et aux couleurs improbables tout en gardant la classe.

*Jean-Paul Lemaitre* qui a eu la folie de me confier des séances de TP pour que je m'imprègne du métier d'enseignant. Maintenant que j'ai quitté mon bureau, tu vas pouvoir ouvrir un paquet de chocolats peinarde, sans que je ne l'entende et sans être obligé de le partager !! Merci en tout cas d'avoir souvent partagé tes en-cas avec moi.

En parlant de chocolat, je remercie également mon fournisseur n°2, *Dominique Garmyn* (vive le commerce équitable !). Puits de science, j'ai toujours pu compter sur toi pour répondre à mes questions. On pouvait également compter sur toi pour mettre l'ambiance aux réunions ;)

*Cécile Revellin* qui nous a souvent fait profiter des bons produits de son jardin. Merci pour toutes les publis que nous sommes allées chercher au sous-sol et ta douceur continue.

*Géraldine Depret* qui m'a épaulée du début à la fin de ma thèse. Je te suis très reconnaissante pour ton investissement en passant par les innombrables plaques de PCR Quantitative et les incalculables extractions de sols (mais où est *Enterococcus*

*faecalis* ?), les préparations d'oraux et surtout pour l'étape finale de correction et d'impression du manuscrit !! Tes conseils et ton aide ont toujours été précieux. J'adore ton franc-parler et l'énergie que tu dégages quand tu fais part de tes opinions !

*Anne-Laure Vivant*, ta venue dans l'équipe un an après moi, pour le début de ta thèse, a marqué le début d'une grande aventure ! Que de bons moments partagés ! Au labo : la musique à fond ; En tamisant des kilos de sols argileux : intamisables ; En s'acharnant sur les mots fléchés du 20 minutes ; En prélèvement : parcourant la petite campagne, initiation au terrain et à la tarière ; Au ski : on regarde droit devant ! En soirées : on ne sait jamais comment ça va finir ! Tu m'as fait découvrir 2 grandes choses qui m'étaient inconnues jusque-là : la mode et le sport ! Tu m'as convertie à la course à pied, et ce n'était pas gagné !! Tu m'as également initiée à la mode. Moi qui partais de loin, tu m'as littéralement transformée en fashion victim ! Merci de m'avoir soutenue en toutes circonstances !

*Sébastien Solanas* (Bernadette) avec qui j'ai partagé le bureau pendant une grande partie de ma thèse. Ma Bernadette, tu as été un voisin formidable, plus, une confidente qui était toujours présente pour écouter mes tourments et subvenir à mes besoins. Je retiendrai les fous rires, les musiques chelous (la fourmi veut pas donner son miam...) et tous les bons moments que nous avons partagés.

*Gilles Boussemart*, que l'on repère à 2 couloirs à la ronde avec son bagout de p'tit gars du nord. Grâce à toi, il y avait toujours du gâteau à la salle café. Merci de t'être coupé les cheveux à mi-parcours de ton post-doc, la coupe de John Travolta dans *Pulp Fiction*, c'était plus possible !

*Elodie Barbier*, tu bénéficiais déjà d'une grande expérience et d'une grande sagesse quand tu as débuté ta thèse dans notre équipe. Les discussions scientifiques que nous avons eues m'ont toujours rassurée. Tu as été la source de motivation pour aller aux réunions biblio du vendredi midi !

*Murielle Dequaire-Rochelet*, tu as toujours été souriante et très aimable.

*Céline Fosnot*, stagiaire très sympathique que j'espère pouvoir recroiser par la suite.

Je remercie les stagiaires qui ont travaillé à mes côtés sur mon sujet, notamment *Cyrielle Dumont*.

#### Les voisins de couloir :

*Chloé Merlin*, toujours sympa et souriante, je suis enchantée de t'avoir rencontrée.

*Kadia Calderon*, Bonita ! Merci d'avoir pris le temps de lire ma thèse pour me donner ton avis.

*David Bru*, que j'ai connu à l'INRA bien avant ma thèse, pour mon premier stage de master. Comme l'appareil de Q-PCR que j'utilisais jadis, David traine dans le labo et fonctionne toujours ;) !! C'est avec grand plaisir que j'ai retrouvé ces 2 engins au début de ma thèse. Les moments partagés en dehors du job étaient toujours fun : les courses à pieds, les journées ski, les pintes au flan ou ailleurs, les rock-band et les parties de badminton !!

*Jérémy Béguet*, le seul, unique et véritable geek du couloir ! Merci de m'avoir fait découvrir Cubeecraft et de m'avoir aidée quelques fois pour mes statistiques. Les soirées Rock Band-dinatoires passées chez toi étaient toujours réussies et j'espère en refaire d'autres !

Je remercie les 2 boute-en-train *Nadine Rouard* et *Marie-Christine Breuil* que j'ai souvent sollicitées au cours de ma thèse. Vos personnalités très enjouées et plutôt comiques mettaient une super ambiance dans la salle café !

*Romain Barnard*, tu es un jeune homme bien sympa. Je suis ravie de partager mes séances de sport avec toi.

*Aymé Spor*, qui porte bien son nom : on l'aime et il fait du sport ! Grand merci pour ta collaboration ! De par tes compétences exceptionnelles en statistique, tu as su

sublimer mes résultats ! On a toujours eu de bonnes tranches de rigolades que ce soit en travaillant ou en jouant au badminton !

Spéciale dédicace à *Marion Devers* ! Merci pour tout ! Tu m'as aidée et soutenue toute ma thèse pour le meilleur et pour le pire ! Au travail, j'ai pu compter sur toi pour discuter de mes problèmes scientifiques afin de les surmonter. Tu m'as rendue de grands services, en particulier à la fin de ma thèse lors du rush de l'impression de mon manuscrit. Je te remercie de m'avoir initiée au badminton et introduite dans le monde du sport à la fac ! Tu es devenue une véritable amie et j'espère bien que nous continuerons à partager de grands moments !

*Fabrice Martin*, sens de l'humour aiguisé et toujours prêt à blaguer !

Les camarades qui ont débuté leur thèse la même année que moi : *Farhan Haffez*, *Clémentine Lepinay* et *Muhammad*

Les amis étrangers qui sont venus, puis repartis :

*Ines Petric*, avec toi j'ai appris à m'exprimer en anglais au quotidien ! Nous étions très complices ce qui nous a permis de partager des soirées formidables ! Malheureusement, ta présence au labo n'était que temporaire et tu es repartie en Croatie mais cela n'entrave en rien notre amitié.

*Chris Jones*, toujours joyeux et plein d'énergie. Les sorties que l'on a fait ensemble étaient toujours réussies.

Tous mes autres collègues de l'étage :

*Samuel Dequiedt* qui s'est toujours montré disponible pour répondre à mes questions concernant le RMQS et les procédures d'extraction d'ADN. Il a donné de son temps, surtout la première année pour m'aider à traiter mes résultats de PCR.

*Mélanie Lelièvre* avec qui j'ai interagi et qui m'a fournie des ADN de sol nécessaires à mon travail.

*Sébastien Terrat*, nous nous étions rencontrés au congrès ISME avant de nous retrouver à Dijon ! Merci pour ta sympathie.

*Anne-Laure Blieux*, qui a fait partie de mon équipe mais qui a maintenant basculée du côté obscur de la force !! En plus des soirées endiablées, nous avons fait plein de sport ensemble, nous avons même acclamé Cricri en bas des pistes !

La douce *Emilie Bourgeois*, avec qui j'ai passé de bonnes soirées.

*Florentin Constancias*, l'hurluberlu de l'étage ! Avec lui, un Kir suffit ! Tes petites mimiques, ton style vestimentaire de mec de l'UMP avec un côté anarcho-rebel de la société malgré tout, tes blagues bien particulières que toi seul maîtrise font de toi un personnage unique et inoubliable. Ta présence à une fête est un délice !

*Vincent Tardy*, joyeux luron avec qui on passe toujours de bonnes soirées ! J'espère pouvoir assister encore à tes merveilleuses performances footballistiques ou à tes prestations de break dance, notamment la position du scorpion ! Je salue également *Julie* avec qui j'apprécie faire la fête et des parties de badminton.

*Pierre Plassart*, le grand sage. Tu as toujours pris du temps pour répondre à mes questions. Je remercie également ta femme, *Samira Khaldi* pour les jolies boucles d'oreilles qu'elle m'a fabriquées à la fin de ma thèse.

*Cédric Le Guillou*, grâce à toi j'ai un fabuleux jardin, ou rien ne pousse pour le moment mais ça viendra ! Avec toi, les soirées finissaient, mais on ne sait pas comment !

*Marie-Reine Allard*, spécialiste des grilles de mots fléchés de niveau 4 et plus !! C'était toujours un plaisir de te voir à la salle café.

*Christian Steinberg*, vous êtes à mon sens un des plus grands sportifs de l'étage ! L'expérience de la course contre le cancer que nous avons partagée était très enrichissante. Merci pour votre participation et votre constante amabilité.

*Nadine Gautheron* et *Véronique Edel-Hermann*, toujours très aimables.

*Abdel Echairi* tu as toujours été généreux et de bonne humeur. Malgré ta vie de famille bien remplie, tu t'es montré disponible pour passer de bonnes soirées avec tes amis ! Je me rappellerai toujours de tes talents de jardinier et de cuisinier !!

A tous les anciens collègues du 2<sup>nd</sup> étage :

*Marine Peyret-Guzzon*, *Lucie Trda*, *Léonardo Casieri*, *Marie-Lara Bouffaud*, *Soukayna Hayek*, *Franck Robert*, *Nicolas Ligny* et tous ceux que j'oublie avec qui j'ai partagé des parties de ping-pong endiablées et des soirées arrosées.

Virginie, la reine de la truffe, tu es quelqu'un de chaleureux avec qui on passe de bonnes soirées ! J'espère te revoir !

Les secrétaires que j'ai sollicitées :

*Catherine Morel* et *Fabienne Garcia*, qui m'ont souvent aiguillée pour passer les commandes, pour gérer les déplacements et les participations aux congrès.

*Sylvie Belotti* et *Stéphanie Busset* à qui je m'adressais régulièrement pour tout un tas de questions à 2 francs. Vous étiez toujours disposées à m'aider.

Les personnes extérieures avec qui j'ai collaboré au cours de ma thèse :

*Jean Thioulouse*, qui a eu l'amabilité de me recevoir à Lyon durant ma première année de thèse. Il a mis à disposition toutes ses compétences en statistiques afin de m'aider à traiter des données PCR.

*Nicolas Saby* que j'ai sollicité pour collecter les informations relatives RMQS.

*Claudy Jolivet* qui nous a fourni des échantillons de sols indispensables au déroulement de mes expériences. Merci pour votre implication, vos conseils avisés et pour la relecture des articles.

Remerciement clin d'œil à Pôle emploi qui a financé ma dernière année de thèse ;)

Pour finir par le meilleur, je remercie le bichon Fabien Morin. Merci pour ton soutien sans faille qui m'a permis de tenir jusqu'au bout. En plus du doctorat, je repars de l'INRA avec le gros lot !

## Sommaire

<b>Introduction générale</b>	<b>3</b>
<b>Partie I : Synthèse bibliographique</b>	<b>7</b>
<b>I ó Le sol : un écosystème complexe</b>	<b>7</b>
I ó 1 ó Constituants et propriétés physiques	7
I ó 1 ó 1 ó La phase solide du sol	7
I ó 1 ó 2 ó La phase liquide du sol	10
I ó 1 ó 3 ó La phase gazeuse du sol	11
I ó 2 ó Les propriétés chimiques	11
I ó 2 ó 1 ó Les ions	12
I ó 2 ó 2 ó Le complexe argilo-humique	12
I ó 2 ó 3 ó La capacité d'échange cationique	12
I ó 2 ó 4 ó Le taux de saturation en cations basiques	12
I ó 2 ó 5 ó Le pH	13
I ó 3 ó Les organismes vivants du sol	13
I ó 3 ó 1 ó Diversité des êtres vivants	13
I ó 3 ó 2 ó La microflore bactérienne	14
I ó 4 ó Le réseau de surveillance de la qualité des sols en France	15
<b>II ó Choix et description des bactéries pathogènes modèles</b>	<b>16</b>
II ó 1 ó Les bactéries pathogènes dans le sol	16
II ó 2 ó Sélection des bactéries pathogènes	17
II ó 2 ó 1 ó <i>Salmonella</i> spp.	18
II ó 2 ó 2 ó <i>Listeria monocytogenes</i>	20
II ó 2 ó 3 ó <i>Escherichia coli</i>	22
II ó 2 ó 4 ó <i>Enterococcus faecalis</i>	24
<b>III ó Pratiques agricoles et risque de transfert des bactéries pathogènes dans le sol</b>	<b>26</b>
III ó 1 ó Les effluents d'élevage et matières fécales	26
III ó 2 ó Les boues de station d'épuration	28
III ó 3 ó L'irrigation	29
<b>IV ó Survie des bactéries pathogènes dans le sol</b>	<b>31</b>
IV ó 1 ó Influence des paramètres physico-chimiques et du mode d'occupation du sol	32
IV ó 1 ó 1 ó La texture du sol	32
IV ó 1 ó 2 ó Le pH	33
IV ó 1 ó 3 ó Nutriments et matière organique	33
IV ó 1 ó 4 ó Mode d'occupation du sol	35
IV ó 2 ó Les paramètres biotiques du sol	38
IV ó 2 ó 1 ó Impact des microorganismes totaux	38
IV ó 2 ó 2 ó Impact des communautés bactériennes	38
IV ó 2 ó 3 ó Action des protozoaires	39
IV ó 3 ó Les paramètres environnementaux	40
IV ó 3 ó 1 ó La température	40
IV ó 3 ó 2 ó L'humidité	42

<b>V ó Le sol : un vecteur de contamination des bactéries pathogènes</b>	<b>43</b>
V ó 1 ó Rôle du sol dans la contamination des végétaux	43
V ó 1 ó 1 ó Transfert des bactéries pathogènes d'un sol contaminé aux graines des végétaux	43
V ó 1 ó 2 ó Contamination indirecte par éclaboussures	44
V ó 1 ó 3 ó Internalisation des pathogènes par les végétaux	45
V ó 2 ó Rôle du sol dans la contamination de l'environnement - Transport et diffusion des bactéries pathogènes dans le sol	46
V ó 2 ó 1 ó Lessivage et transport vertical dans le sol	47
V ó 2 ó 2 ó Ruissellement et transport horizontal sur le sol	48
V ó 2 ó 3 ó Exemples d'épisodes de contamination par transport des bactéries pathogènes du sol aux ressources en eau	49
<b>VI ó Objectifs de la thèse</b>	<b>50</b>
 <b>Partie II : Résultats ó Etude de l'incidence et de la distribution de <i>L. monocytogenes</i> et <i>E. faecalis</i> dans les sols à l'échelle du territoire français</b>	<b>53</b>
Article 1 ó Nation-wide study of the occurrence of <i>Listeria monocytogenes</i> in French soils using culture-based and molecular detection methods.	54
Article 2 ó Etude de l'incidence et de la distribution d' <i>E. faecalis</i> à l'échelle du territoire français	64
 <b>Partie III : Résultats ó Impact des facteurs biotiques et abiotiques sur la survie de <i>L. monocytogenes</i> et d'<i>E. faecalis</i> dans les sols</b>	<b>79</b>
Article 3 ó Biotic and abiotic soil properties influence survival of <i>Listeria monocytogenes</i> in soil	80
Article 4 ó Etude de la survie d' <i>E. faecalis</i> en fonction des paramètres biotiques et abiotiques des sols ó Comparaison avec <i>L. monocytogenes</i>	98
 <b>Partie IV : Discussion générale et perspectives</b>	<b>113</b>
 <b>Références bibliographiques</b>	<b>118</b>



## Liste des figures

	Page
Figure I-1. Volume (%) des constituants solides du sol (fraction minérale et organique) et de l'espace poral (occupé par l'air et l'eau).	7
Figure I-2. Triangle des textures minérales des sols (d'après USDA, 1975).	8
Figure I-3. Evolution et décomposition de la matière organique fraîche dans le sol.	9
Figure I- 4. Organisation hiérarchique des différentes particules organiques et minérales du sol en agrégats.	10
Figure I-5. Répartition des sites RMQS et des sites Biosoil sur le territoire français.	16
Figure 1. Standard curve for the real-time PCR targeting the <i>L. monocytogenes prs</i> gene.	59
Figure 2. Influence of soil DNA extracts on the efficacy of PCR amplification of a 200 bp-fragment of the pGEM-T plasmid.	60
Figure II-3. Gamme étalon utilisée pour la quantification de <i>E. faecalis</i> dans les ADN de sols.	69
Figure III-1. Distribution of the 100 soils in the textural triangle.	84
Figure III-2. Relationship between pH and corresponding BCSR of the 100 non-sterile soils.	89
Figure III-3. Survival of <i>Listeria monocytogenes</i> in nine soils (A) non-sterile and (B) sterile.	90
Figure III-4. Mean survival ratios of <i>L. monocytogenes</i> in non-sterile and sterile soils with variable pHs.	90
Figure III-5. Distribution des 100 sols utilisés dans le triangle des textures.	101
Figure III-6. Survie de <i>E. faecalis</i> dans 9 sols (A) non-stériles et (B) stériles.	102
Figure III-7. Taux de survie moyen de <i>E. faecalis</i> dans les sols non-stériles et stériles en fonction du pH du sol.	103
Figure III-8. Distribution des 100 sols utilisés dans le triangle des textures.	104
Figure III-9. Comparaison des taux de survie moyens entre <i>L. monocytogenes</i> et <i>E. faecalis</i> dans les sols non-stériles et stériles en fonction du pH du sol.	105

## Supplementary file

Table S1. Forty soils parameters, including soil texture, soil chemistry, land-use, climatic data and spatial localization characterizing the 100 non-sterile soils.  
(disponible en ligne lorsque l'article sera paru sur <http://www.plosone.org/>)

# Liste des tableaux

	Page
Tableau I-1. Dimension et propriété des éléments minéraux composant le sol (d'après Hénin, 1976).	8
Tableau I-2. Fonction des principaux ions (cations et anions) présents dans les sols.	12
Tableau I-3. Diversité et abondance des organismes vivants composant la faune et la microflore du sol.	13
Tableau I-4. Incidences et concentrations de bactéries pathogènes et d'indicateurs de contamination fécale dans des fumiers frais issus de plusieurs espèces animales.	28
Tableau I-5. Seuils de références pour les teneurs en micro-organismes pathogènes dans les boues hygiénisées (suivant l'arrêté du 8 janvier 1998 relatif aux épandages de boues sur les sols agricoles).	29
Tableau I-6. Normes microbiologiques définissant la qualité sanitaire des eaux usées traitées	30
Tableau I-7. Niveau de qualité sanitaire des eaux usées traitées exigé selon le type de culture à irriguer.	30
Table 1. Bacterial strains and corresponding C <sub>T</sub> value obtained in real-time PCR to validate the specificity and detection limits of the <i>prs</i> real-time PCR TaqMan assay.	57
Table 2. Land use of the 1315 soil samples used for DNA extraction and <i>L. monocytogenes</i> detection with <i>prs</i> real-time PCR TaqMan assay.	58
Table 3. Estimation of the detection and quantification limit of the <i>prs</i> real-time PCR TaqMan detection system with DNA extracted from control and spiked microcosms.	60
Table 4. Occurrence of culturable <i>Listeria</i> sp. and <i>L. monocytogenes</i> in fresh soil samples: comparison of enrichment procedures.	61
Table 5. Detection of <i>Listeria</i> sp. and <i>L. monocytogenes</i> in 53 soil samples by culture-based enrichment method or real-time PCR targeting the <i>prs</i> gene.	61
Tableau II-6. Validation de la spécificité du système de détection <i>ecf</i> pour la détection d' <i>E. faecalis</i> par PCR quantitative: souches bactériennes et valeurs de Ct correspondantes.	65-66
Tableau II-7. Estimation de la limite de détection et de quantification du système TaqMan <i>ecf</i> sur des ADN extraits de sols contrôles ou de sols inoculés avec des quantités connues d' <i>E. faecalis</i> .	70
Tableau II-8. Détection d' <i>E. faecalis</i> par méthodes culturales (dénombrement direct et enrichissement) et par PCR quantitative avec le système de détection <i>ecf</i> dans 53 échantillons de sols frais.	71-72
Table III-1. Land use and main edaphic factors of the subset of nine soils.	85
Table III-2. Partitioning of the variation of survival ratios of <i>Listeria monocytogenes</i> as a function of contextual variables.	88
Table III-3. Contribution of the five most important explanatory variables to the variation in survival ratios of <i>Listeria monocytogenes</i> .	88
Table III-4. Analysis of variance for <i>Listeria monocytogenes</i> survival ratios in a subset of nine soils.	91
Tableau III-5. Contribution des variables explicatives dans la variation du taux de survie d' <i>E. faecalis</i> .	102
Tableau III-6. Analyse de la variance des taux de survie d' <i>E. faecalis</i> et de <i>L. monocytogenes</i> dans 9 sols en fonction du pH, du mode d'occupation et de la microflore des sols.	102

# *Introduction générale*

## Introduction générale

Le sol est un compartiment essentiel de tous les écosystèmes continentaux. Le sol constitue le support des racines des plantes et joue également un rôle primordial dans la fourniture d'eau et la nutrition des plantes. En effet, le sol est un compartiment moteur des grands cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote, du phosphore, du soufre et de nombreux métaux. Le sol constitue donc, dans la biosphère continentale, un immense réservoir et lieu d'échanges d'éléments nutritifs (minéraux et organiques) indispensables à la croissance des végétaux qui composent en partie l'alimentation humaine. Les productions végétales sont aussi la base de l'alimentation des animaux, dont les animaux d'élevages, eux-mêmes source d'alimentation pour l'homme. D'autre part, le sol joue un rôle majeur dans le cycle de l'eau potable qui est indispensable à toute forme de vie. Il assure un rôle de filtre et contribue également au stockage de l'eau.

Au cours de ce siècle, la population mondiale a augmenté, nécessitant un accroissement des productions alimentaires végétales et animales ainsi que des activités humaines en général. Ces activités humaines ont entraîné des bouleversements profonds dans la structure et la composition du sol. De par l'intensification des cultures végétales, les sols se sont appauvris en matières organiques et en éléments minéraux entraînant une réduction de la stabilité et de l'agrégation des sols, une diminution de la capacité de rétention d'eau et une perturbation des cycles biogéochimiques. L'ensemble de ces modifications pourrait à terme altérer la performance des sols à remplir les fonctions nourricières et épuratrices, essentielles pour un fonctionnement durable des écosystèmes, pour le maintien de la qualité de l'environnement et finalement le bien-être et la santé humaine.

Afin de maintenir le taux de productivité du sol, des fertilisants chimiques et organiques ont été utilisés pour enrichir le sol. L'apport de fertilisants organiques est une pratique de choix car elle permet de recycler une grande partie des matières fécales produites par les animaux de rente (fumier, lisier et fiente) et des déchets urbains ou industriels générés par l'homme (boues de station d'épuration, composts). Cependant, l'épandage de ces produits résiduels organiques (PRO) peut entraîner une dégradation de la qualité des sols, de l'environnement et des productions agricoles. En effet, les amendements organiques ou PRO contiennent des éléments nutritifs comme les nitrates, phosphates et de la matière organique

plus ou moins stabilisée, mais peuvent également contenir des contaminants chimiques : éléments traces métalliques, HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques), des résidus de substances médicamenteuses (hormones, antibiotiques <sup>1</sup> ), qui peuvent polluer l'atmosphère, le sol et peuvent être également transférés vers les eaux de surface et/ou les nappes d'eau souterraines (par ruissellement et/ou lessivage). En plus des pollutions chimiques, les amendements organiques peuvent être à l'origine de pollutions microbiologiques car ils peuvent héberger des organismes pathogènes tels que des parasites, des bactéries, des virus et des champignons. L'introduction de microorganismes pathogènes dans le sol peut également aboutir à la contamination de l'environnement. Suite à l'épandage d'amendements organiques contaminés sur le sol, les microorganismes pathogènes peuvent être transportés par les eaux de ruissellement et atteindre les parcelles avoisinantes ou atteindre les cours d'eau et les nappes phréatiques en cas de lessivage important. L'épandage sur les sols de prairie entraîne un risque de contamination directe des animaux qui y pâturent si les microorganismes pathogènes persistent dans les sols au-delà de la période de retrait des animaux. De plus, la présence de bactéries pathogènes dans les sols de cultures peut induire la contamination des végétaux et produits maraîchers destinés à l'alimentation animale et humaine. Les toxi-infections alimentaires (TIA) atteignent un grand nombre de personnes chaque année à l'échelle mondiale. La contamination des ateliers agroalimentaires et des aliments par des bactéries pathogènes est souvent liée à la contamination des matières premières utilisées dans ces industries. Une contamination d'origine environnementale des matières premières végétales et animales lors de la production agricole est un problème qu'il faut prendre en compte (approche de « la fourche à la fourchette »). Des chiffres en France indiquent que pour trois ans : entre 2006 et 2008, 3127 foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ont été déclarés en France, impliquant 33 404 malades, 2 302 hospitalisations et 15 décès (Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire de l'INVS (BEH), INVS 27 juillet 2010 / n°31-32). Ces chiffres de l'INVS ne concernent que les infections collectives et constituent donc une estimation très minimaliste. Les chiffres de TIA dans d'autres pays (en Amérique du Nord en particulier) sont beaucoup plus élevés.

De par son rôle essentiel d'interface vis-à-vis des autres compartiments environnementaux (atmosphère, hydrosphère et biosphère), le sol est le lieu où transitent les flux de matières, d'énergie et de polluants avant d'atteindre les autres compartiments. Ainsi, l'introduction de microorganismes pathogènes dans le sol peut aboutir à la contamination de l'environnement et engendrer un risque sanitaire élevé pour les hommes et les animaux. Le

maintien de la qualité des sols, notamment d'un point de vue microbiologique, est donc un enjeu capital en terme de santé publique.

C'est dans ce contexte que le projet Patho-RMQS « Répartition géographique des bactéries pathogènes de l'homme dans les sols : effet des constituants et de l'urbanisation » a vu le jour, et a été financé par l'ANR (Agence Nationale de la Recherche) Santé Environnement Santé Travail (SEST). Ce programme (coordonné par Sylvie Nazaret, UCB Lyon I /CNRS) vise à apporter des éléments de compréhension sur le comportement de bactéries pathogènes primaires ou opportunistes dans l'écosystème complexe qu'est le sol. Hormis le réservoir humain et animal, peu d'informations sont disponibles sur l'incidence et la concentration des bactéries pathogènes dans la nature, et notamment dans le sol, interface ouverte sur les différents compartiments de l'environnement. Le premier objectif du projet Patho-RMQS vise à dresser un bilan de la qualité microbiologique des sols en France. Plus de 1000 sols seront analysés pour mettre en évidence la présence potentielle de bactéries pathogènes ainsi que leur concentration. Ces résultats pourront être comparés avec les doses minimales infectieuses pour définir l'importance du danger que représente la présence des bactéries pathogènes dans le sol. Les résultats de l'incidence des bactéries pathogènes seront représentés sous forme de cartographie afin d'identifier les zones géographiques à risque susceptibles de contaminer l'homme et d'entraîner la dissémination des bactéries pathogènes dans l'environnement. Le second volet de ce projet a pour but d'identifier et de hiérarchiser les facteurs abiotiques (facteurs physico-chimiques, climatiques, couvert végétal et mode d'occupation des sols, type d'amendement épandu ) et biotiques (structure et densité des communautés bactériennes indigènes et autres microorganismes) qui déterminent la répartition et le comportement des bactéries pathogènes dans les sols français. L'identification des sols favorables à la survie, au développement et à la dispersion des bactéries pathogènes servira à alimenter, au niveau national, des modèles de microbiologie prévisionnelle des sols visant à gérer et à réduire le risque de contamination de l'homme et de l'environnement *via* le sol.

Mon travail de thèse, financé par l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie) s'inscrit dans le projet Patho-RMQS et plus généralement dans le thème « Circulation de microorganismes pathogènes dans les agrosystèmes et risque pour l'Homme » du pôle Microbiologie Environnementale et Risque Sanitaire (MERS, dirigé par Alain Hartmann et Frédéric Dalle). Ma thèse a donc été réalisée dans ce pôle au sein de

l'UMR 1347 Agroécologie. Les objectifs de ma thèse seront présentés en détail à la fin du chapitre bibliographique (Partie I).

Ce mémoire est constitué de 4 parties axées sur le rôle du sol dans l'écologie des bactéries pathogènes.

La **partie I** correspond à une synthèse bibliographique qui décrit le contexte scientifique dans lequel s'inscrit ma thèse ainsi que les connaissances actuelles : Après une description de la matrice sol (Chapitre 1), plusieurs modèles de bactéries pathogènes et bactéries opportunistes seront ciblés et décrits (Chapitre 2). Les principales sources d'introduction de ces bactéries dans le sol seront abordées (Chapitre 3). La survie des bactéries pathogènes et opportunistes dans le sol sera détaillée en expliquant l'influence des paramètres du sol et des paramètres environnementaux (Chapitre 4). Pour finir, les risques de contamination humaine générés par la présence de ces bactéries dans le sol seront exposés (Chapitre 5).

La **partie II** de ce manuscrit est consacrée à la présentation des résultats acquis concernant l'utilisation de la PCR quantitative et d'une méthode culturale classique afin de définir l'incidence d'une bactérie pathogène (article 1) et d'une bactérie opportuniste (article 2) dans un ensemble de sols collectés sur le territoire français. Les résultats présentant l'incidence de la bactérie pathogène sont présentés sous forme d'un article scientifique dont je suis le premier auteur qui a été publié dans Journal of Microbiological Methods.

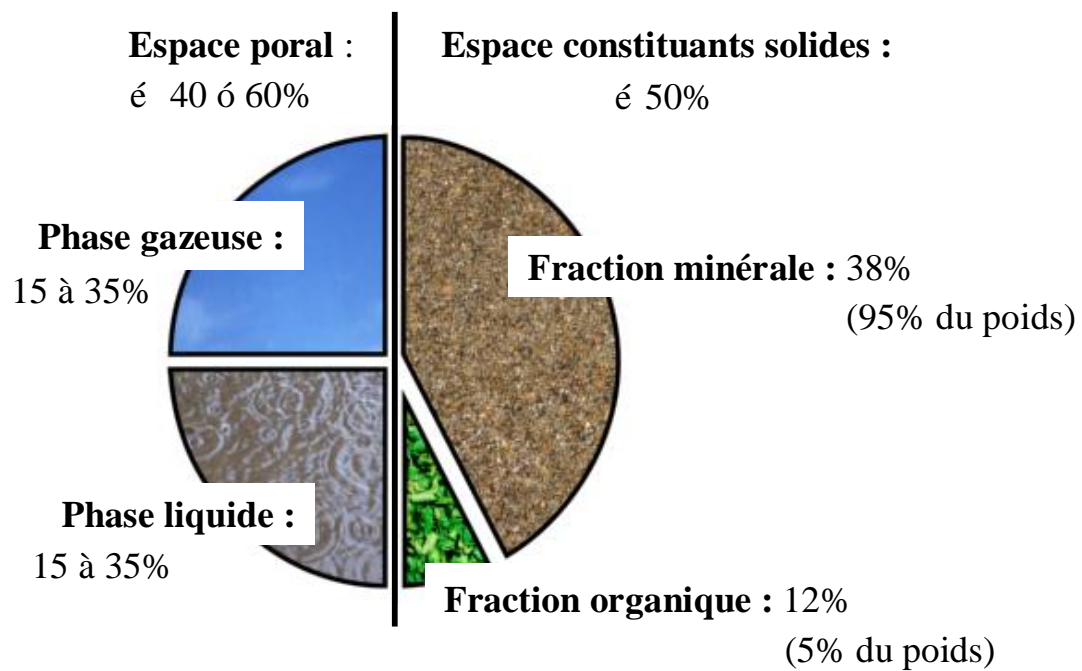
La **partie III** de ce manuscrit est consacrée à l'étude de la survie des deux bactéries, pathogène et opportuniste, dans des sols, à l'aide d'une méthode culturale classique. L'article 3 est axé sur l'influence des paramètres physico-chimiques ainsi que les paramètres pédo-climatiques des sols sur la survie d'une bactérie pathogène (article dont je suis le premier auteur et publié dans la revue PloS one). L'article 4 reprend le même concept que l'article 3 mais la bactérie étudiée est le pathogène opportuniste. Une comparaison des facteurs influençant la survie des 2 modèles bactériens sera réalisée pour conclure ce chapitre.

La dernière partie de ce manuscrit, **partie IV**, présente une discussion générale en guise de synthèse des principaux résultats acquis ainsi que les perspectives de mon travail.

# **Partie I**

## ***Synthèse bibliographique***





**Figure I-1. Volume (%) des constituants solides du sol (fraction minérale et organique) et de l'espace poral (occupé par l'air et l'eau).**

(Source : [http://stream2.cma.gov.cn/pub/comet/HydrologyFlooding/UnderstandingtheHydrologicCycleInternationalEdition/comet/hydro/basic\\_int/hydrologic\\_cycle/print.htm#page\\_4.4.0](http://stream2.cma.gov.cn/pub/comet/HydrologyFlooding/UnderstandingtheHydrologicCycleInternationalEdition/comet/hydro/basic_int/hydrologic_cycle/print.htm#page_4.4.0))

## **Partie I : Synthèse bibliographique**

### **I ó Le sol : un écosystème complexe**

---

Le sol est la couche externe de la croûte terrestre caractérisée par sa structure solide et sa nature minérale mais également par la présence de nombreux êtres vivants. La formation des sols est liée à la transformation de la roche mère sous l'effet des facteurs climatiques mais aussi sous l'effet des organismes vivants (microorganismes, plantes et animaux). Il est le siège d'un échange intense de matière et d'énergie entre l'air, l'eau et les roches. Le sol, occupe une position clé dans la biosphère continentale car il contribue de manière primordiale aux cycles biogéochimiques des éléments majeurs et des éléments traces. Le sol est donc un écosystème complexe, un bioréacteur et un filtre indispensable à la vie sur terre. Il possède des propriétés physiques caractérisées par sa texture et sa structure, des propriétés chimiques influencées par la nature des matériaux qui le composent et des propriétés biologiques liées à la présence de très nombreux micro-organismes mais aussi organismes végétaux (racines des plantes supérieures, micro-algues) et animaux (micro et mésofaune du sol).

#### **I ó 1 ó Constituants et propriétés physiques**

Le sol est un milieu triphasique composé d'une phase solide (minérale et organique), d'une phase liquide et d'une phase gazeuse (Figure I-1, d'après (Robert 1996)).

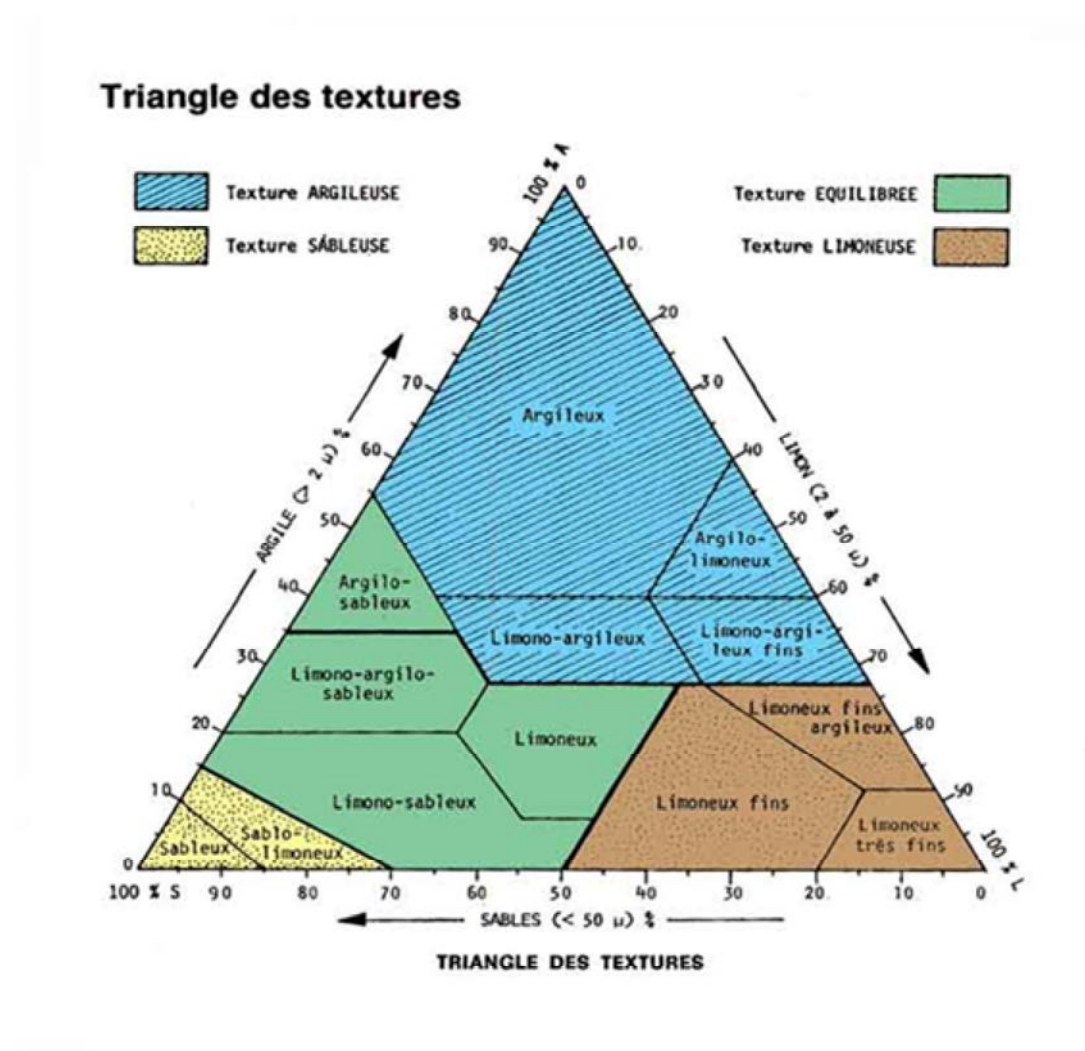
##### I ó 1 ó 1 ó La phase solide du sol

- La fraction minérale

La fraction minérale du sol provient de la dégradation superficielle de la roche mère. D'une part, des processus physiques, imposés par le climat (érosion par le vent, le gel, l'eau), fragmentent la roche mère en morceaux de plus en plus fins, ceci, sans en altérer sa composition minéralogique initiale. D'autre part, des réactions chimiques (dissolution, oxydo-réduction, hydrolyse et hydratation) vont transformer la roche mère aboutissant à la formation de minéraux secondaires tels que les argiles, les hydroxydes de fer et les ions.

**Tableau I-1. Dimension et propriété des éléments minéraux composant le sol** (d'après Hénin, 1976).

Eléments minéraux	Diamètre (µm)	Absorption des ions	Rétention de l'eau	Perméabilité
Argile	< 2	Forte	Forte	Faible
Limon fin	2 à 20	Faible	Moyenne	Faible
Limon grossier	20 à 50			
Sable fin	50 à 200	Nulle	Nulle	Forte
Sable grossier	200 à 2000			



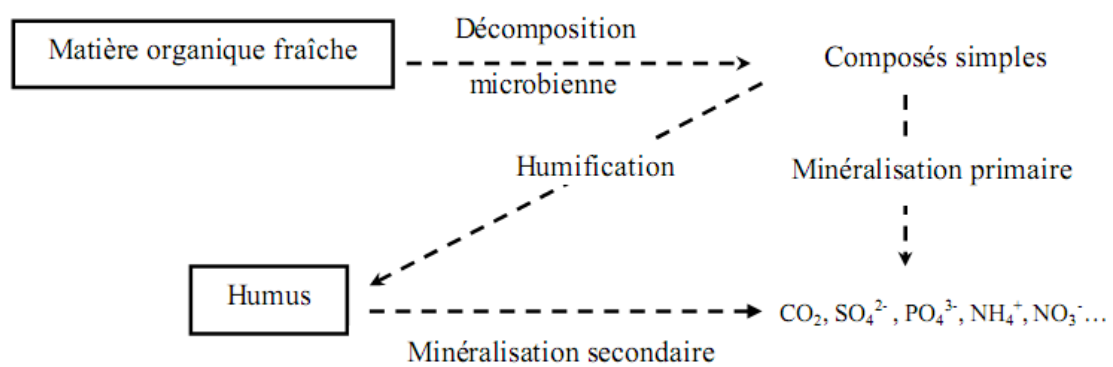
**Figure I-2. Triangle des textures minérales des sols** (d'après USDA, 1975). (Source : <http://lesbeauxjardins.com/jardinons/gazon/sol.htm>)

Les principaux constituants minéraux du sol sont l'argile, le limon et le sable. Ces trois éléments sont classés selon leur diamètre et arborent des propriétés physico-chimiques propres (Tableau I-1) (Hénin 1976). Le sable et le limon sont des constituants chimiquement inertes car ces grains portent peu de charges électriques. En comparaison au sable et au limon, l'argile est l'élément le plus fin mais aussi le plus réactif. Les argiles présentent 3 propriétés importantes qui varient selon leur structure minéralogique. Les argiles présentent une charge globale négative qui leur permet de fixer et relarguer les ions  $H^+$  et les cations métalliques présents dans le sol. Le taux d'argile dans un sol va donc conditionner la capacité d'échange cationique et le pH du sol (Bronick and Lal 2005). Les argiles sont hydrophiles et peuvent fixer les molécules d'eau ce qui intervient sur la réserve hydrique du sol. Enfin, les argiles sont des colloïdes et peuvent se présenter sous forme dispersée (suspension homogène des particules dans l'eau) ou floculée (regroupement des particules en petits agrégats). De par ces propriétés, les argiles jouent un rôle central dans le sol influençant sa structure, sa porosité ou sa capacité d'échange ionique.

La proportion relative de sable, de limon et d'argile qui constitue le sol définit sa texture. Il existe une douzaine de classes texturales comme représenté dans le diagramme référentiel nommé le triangle des textures (Figure I-2) (USDA 1975). La texture du sol est une propriété stable dont l'évolution demande plusieurs milliers d'années en fonction de la roche mère.

- La fraction organique

Au sens strict, la fraction organique du sol regroupe : (1) la matière organique vivante, animale ou végétale, qui englobe la totalité de la biomasse en activité, (2) les débris d'origine végétale et animale regroupés sous le nom de « matière organique fraîche », (3) les composés organiques intermédiaires, appelés « matière organique transitoire », provenant de la transformation de la matière organique fraîche, et (4) l'humus qui forme les horizons organiques superficiels et qui résulte de la décomposition des autres fractions de la matière organique (Calvet 2003). Ce paragraphe est axé sur la matière organique fraîche et les produits transitoires et finaux issus de sa transformation. La matière organique vivante sera abordée dans un autre chapitre.



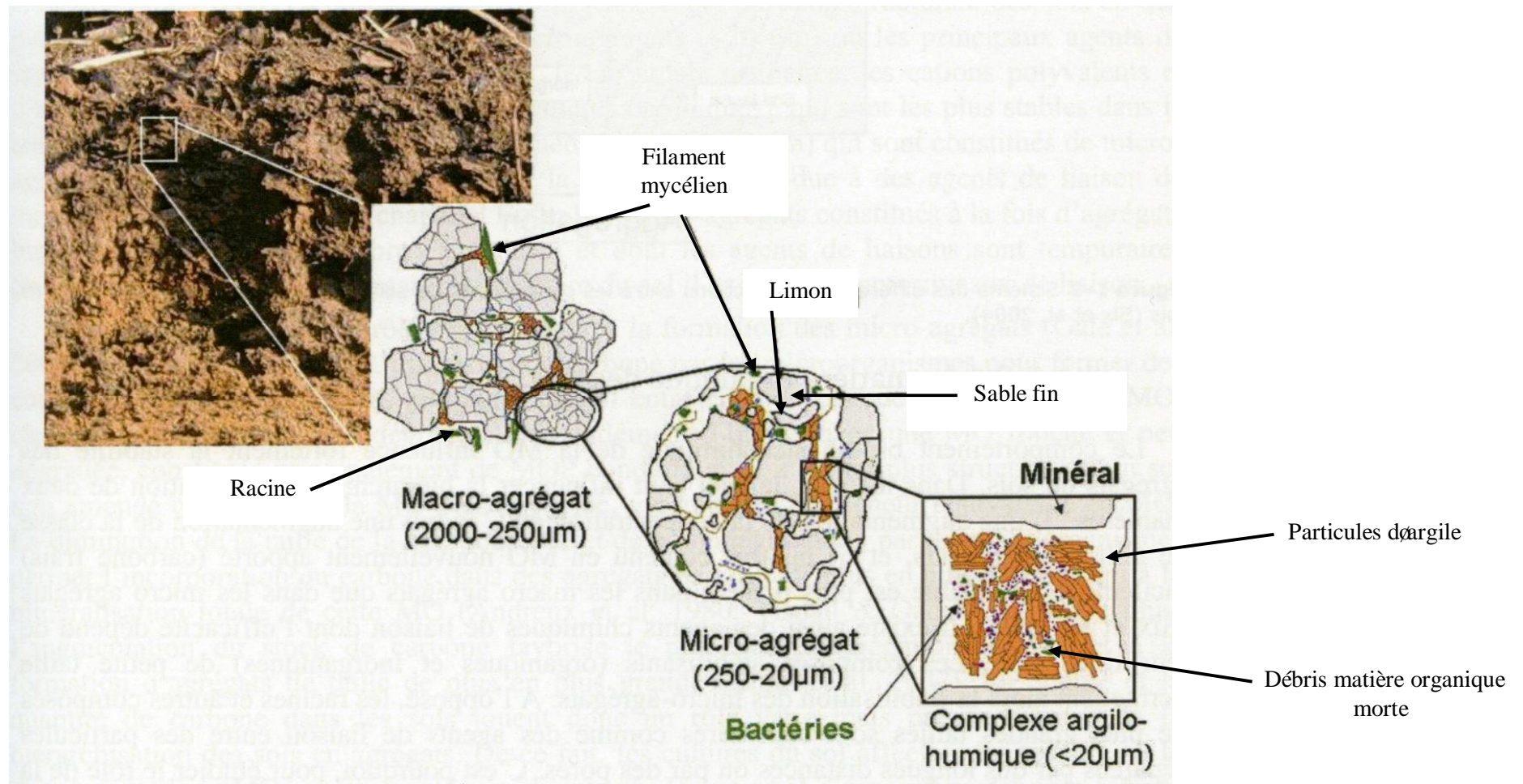
**Figure I-3. Evolution et décomposition de la matière organique fraîche dans le sol.**

La matière organique fraîche du sol est constituée de débris d'origine végétale (feuilles mortes, résidus de culture, exsudats) et animale (déjections, cadavres). Sa composition est liée au couvert végétal et aux activités de surface du terrain. La matière organique fraîche est composée de substances hydrocarbonées (sucres solubles, amidon, cellulose, lignine, matières grasses, résines), de matières azotées (surtout sous forme de protéines) et de sels minéraux libres (calcium, magnésium, potassium, sodium...). Les molécules complexes de la matière organique fraîche subissent d'abord une décomposition microbienne qui libère des composés transitoires simples, le plus souvent solubles (sucres, acides aminés, cellulose). Ces composés transitoires peuvent alors suivre deux voies de transformation (Figure I-3):

- La minéralisation primaire : Les composés intermédiaires peu résistants (comme les glucides, les protéines et les acides aminés, ainsi que les lipides et les acides nucléiques) sont transformés en composés minéraux solubles ou gazeux. Cette phase se déroule principalement sous l'action de la faune du sol et des micro-organismes (bactéries et champignons). Si elle est totale, les produits de la transformation sont des cations, des anions et des molécules simples. Cette transformation est d'autant plus rapide que le sol est biologiquement actif.

- L'humification : Les composés simples sont réorganisés et polymérisés ce qui génère de nouvelles molécules plus complexes et plus stables portant le nom de substances humiques ou d'humus. L'humus se minéralise à son tour mais beaucoup plus lentement que la matière organique fraîche : c'est la minéralisation secondaire (Duchaufour 1984). Tout en partant des mêmes éléments précurseurs, la qualité des humus produits dépendra des conditions physico-chimiques qui règnent dans le sol. Le pH, la teneur en oxygène, la teneur en cations seront déterminants.

L'humus peut présenter des charges négatives dues à la dissociation des atomes d'hydrogène localisés sur les groupements carboxyles et phénols. De par ces charges négatives, l'humus va interagir avec certains ions du sol tels que les ions ferriques, l'aluminium et le calcium. Dans les sols, les acides humiques vont être associés aux argiles par l'intermédiaire des cations bivalents pour former le complexe argilo-humique.



**Figure I-4. Organisation hiérarchique des différentes particules organiques et minérales du sol en agrégats.**



▪ La structure du sol

La structure du sol est le résultat de l'agencement des particules minérales et organiques entre elles. Les différentes particules de sable, de limon et d'argile sont cimentées entre elles par différents agents de liaisons (organiques ou minérales) et forment des agrégats (Tisdall and Oades 1982; Bronick and Lal 2005). L'assemblage des agrégats suit une organisation structurale hiérarchique qui s'établit en plusieurs étapes (Figure I-4) (Tisdall and Oades 1982). Tout d'abord les particules d'une taille inférieure à 20  $\mu\text{m}$  telles que les particules d'argile, la matière organique morte (débris fongiques, bactériens, racinaires, humus, polysaccharides) et vivante (bactéries) s'assemblent. L'argile et l'humus sont dotés de charges négatives mais s'associent par l'intermédiaire de cations polyvalents (ponts calciques, ponts aluminium), d'hydroxydes de fer ou d'aluminium et d'aluminosilicates (Tisdall and Oades 1982). Cette association constitue le complexe argilo-humique (CAH), ou complexe adsorbant du sol. Les complexes argilo-humiques s'agglomèrent aux particules minérales plus grosses (limon et sable fin) pour former des microagrégats dont la taille se situe entre 20 et 250  $\mu\text{m}$ . La réunion des microagrégats avec des particules de sable grossier, des racines et des filaments mycéliens aboutit à la formation de macroagrégats dont la taille est supérieure à 2000  $\mu\text{m}$  (Tisdall and Oades 1982). L'empilement des particules minérales et organiques dans les micro et macroagrégats du sol laisse des espaces vides qui constituent la porosité du sol (Callot *et al.* 1982). Les pores formés à l'intérieur et entre les agrégats conditionnent la circulation de la phase liquide et de la phase gazeuse entre les particules du sol.

La structure détermine de manière considérable le fonctionnement du sol. Elle agit, d'une part, sur la pénétration des racines dans le sol et, d'autre part, sur la circulation des éléments nutritifs (Callot *et al.* 1982; Lavelle and Spain 2001). Elle influence également la distribution des microorganismes du sol.

### I6162 6 La phase liquide du sol

La phase liquide du sol n'est pas de l'eau pure mais une solution dont la composition est complexe et variable. Elle est désignée par solution du sol. L'eau peut être adsorbée sur les particules qui composent le sol (argile, matière organique) ou peut circuler dans les porosités du sol. Elle contient de nombreuses substances dissoutes telles que des ions, des molécules organiques et minérales. Leur concentration dans la solution du sol dépend de phénomènes de



dissolution, de désorption, de précipitation et d'adsorption (Calvet 2003; Gobat *et al.* 2010). Bien qu'il soit difficile de définir la composition type de la solution du sol, 2 grandes catégories de solutés peuvent être retrouvées :

- Les micro-éléments dont la concentration est inférieure à  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>. Ce sont les éléments traces métalliques qui rentrent principalement dans cette catégorie.

- les macro-éléments dont la concentration dans la solution du sol dépasse  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>. Les éléments les plus fréquents et les espèces chimiques correspondantes sont : C (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), N (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), Na (Na<sup>+</sup>), Mg (Mg<sup>2+</sup>), Si (Si(OH)<sub>4</sub>), S (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), Cl (Cl<sup>-</sup>), K (K<sup>+</sup>), Ca (Ca<sup>2+</sup>) et O<sub>2</sub>.

La solution du sol est principalement une solution d'électrolytes, généralement une solution peu concentrée dont la molarité totale est souvent de l'ordre de  $10^{-3}$  à  $10^{-5}$  mol/L<sup>-1</sup>. Elle contient des ions H<sup>+</sup> et OH<sup>-</sup> dont les concentrations déterminent le pH du sol (Calvet 2003; Essington 2003; Gobat *et al.* 2010).

### I 6 3 La phase gazeuse du sol

Un mélange de gaz et de vapeur d'eau forme l'atmosphère du sol qui occupe les pores non remplis par la phase liquide. La phase gazeuse du sol est en équilibre avec l'air extérieur mais les concentrations des différents gaz diffèrent, ce qui est lié à la vitesse de diffusion des gaz dans la porosité fine du sol (qui peut être plus ou moins continue). La composition de la phase gazeuse dans le sol présente des fluctuations saisonnières liées à la respiration des racines et à l'activité microbienne du sol. L'O<sub>2</sub> doit être présent dans le sol en quantité suffisante pour répondre aux besoins des plantes et des microorganismes (respiration aérobie). Le CO<sub>2</sub> doit également diffuser vers l'extérieur (Musy and Soutter 1991; Gobat *et al.* 2010).

## **I 6 2 Les propriétés chimiques**

Le sol est une matrice réactive qui est composée d'éléments chargés, minéraux et organiques. Ces éléments interagissent entre eux et confèrent au sol des propriétés chimiques qui interviennent, entre autres, dans la nutrition des plantes.

**Tableau I-2. Fonction des principaux ions (cations et anions) présents dans les sols.**

(Source : <http://unt.unice.fr/uoh/degsoil/fertilite-chimique.php>)

CATIONS (+)	ANIONS (-)
$H^+$ : mesure d'acidité du sol	$NO_3^-$ : élément nutritif ; polluant
$K^+$ : élément nutritif et stabilité structurale	$H_2PO_4^-$ : élément nutritif
$NH_4^+$ : élément nutritif	$HPO_4^{2-}$ : élément nutritif
$Na^+$ : stabilité structurale du sol	$PO_4^{3-}$ : élément nutritif
$Ca^{2+}$ : stabilité structurale	$SO_4^{2-}$ : élément nutritif
$Mg^{2+}$ : stabilité structurale	$OH^-$ : présent mais sans effet
$Al^{3+}$ : stabilité structurale	
$Fe^{3+}$ : stabilité structurale	

### I6261 6 Les ions

Les ions présents dans les sols proviennent essentiellement des processus de dégradation de la roche mère et de minéralisation de la matière organique. Ils peuvent également être introduits par l'intermédiaire de fertilisants chimiques et d'amendements organiques. Le tableau I-2 dresse une liste des principaux ions (cations et anions) ainsi que leurs fonctions dans les sols.

### I6262 6 Le complexe argilo-humique

Le complexe argilo-humique (CAH), ou complexe adsorbant est le résultat de l'association de l'humus et des argiles. Ces deux substances s'associent par l'intermédiaire de ponts calciques, de ponts constitués d'hydroxydes de fer et d'aluminium et de ponts aluminium positionnés aux points de rupture des feuillets d'argile. Le CAH présente une charge globale négative qui lui permet de fixer des cations, et dans une moindre mesure des anions. Les ions sont retenus sous forme échangeable et sont en équilibre avec la solution du sol. Lorsque la concentration en ions est modifiée dans la solution du sol (prélèvement par les racines des plantes, par exemple), certains ions fixés sur le CAH passent en solution (désorption) et sont remplacés par d'autres ions présents auparavant dans la solution du sol (adsorption) (Gobat *et al.* 2010).

### I6263 6 La capacité d'échange cationique

La capacité d'échange cationique (CEC) est la quantité totale de cations qu'un poids déterminé de sol (habituellement 100 grammes) peut adsorber sur son complexe argilo-humique et échanger avec la solution du sol dans des conditions de pH données. Autrement dit, c'est la somme des charges négatives du sol disponibles pour la fixation des ions  $H^+$  et  $Al^{3+}$  ainsi que les cations basiques  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  et  $K^+$ . La CEC dépend donc de la nature des colloïdes présentant un nombre variable et spécifique de sites négatifs et, bien sûr, du pH du sol (Gobat *et al.* 2010).

### I6264 6 Le taux de saturation en cations basiques

Le taux de saturation est le rapport entre la somme des cations basiques échangeables divisé par la CEC. Pour une même valeur de la CEC, le taux de cations basiques peut varier d'un sol à l'autre en fonction de la composition chimique de la roche mère, de l'ajout de fertilisant et du lessivage du sol (Gobat *et al.* 2010).

**Tableau I-3. Diversité et abondance des organismes vivants composant la faune et la microflore du sol.**

(D'après

<http://www.statistiques.developpementdurable.gouv.fr/lessentiel/ar/272/1122/biodiversite-sols.html>)

		Nombre d'espèces	Taille	Abondance <sup>1</sup>	Biomasse <sup>2</sup>
<b>Faune du sol</b>					
Microfaune	Nématodes	65	0,1 à 5 mm	$10^6$ à $10^8$ /m <sup>2</sup>	1 à 30
	Protozoaires	65	0,2 mm	$10^3$ à $10^{11}$ /m <sup>2</sup>	6 à > 30
Mésafaune	Arthropodes inférieurs et enchytraéides	Arthropodes : 140 Enchytraéides : 36	0,2 à 4 mm	$2 \times 10^4$ à $4 \times 10^5$ /m <sup>2</sup>	0,2 à 400
Macrofaune	Lombrics, araignées, myriapodes	Lombrics : 11 Myriapodes : 6	> 4 mm	Lombrics : $10$ à $10^3$ /m <sup>2</sup> Myriapodes : $20$ à $700$ /m <sup>2</sup>	Lombrics : 20 à 400 Myriapode : 0,5 à 12,5
<b>Microflore du sol</b>					
Bactéries		$10^4$ génotypes	0,01 à 0,05 mm	$10^8$ à $10^9$ /g	2 à 200
Champignons		microbiens différents / g	< 1 µm	$10^4$ à $10^6$ /g	100 à 150
Algues			0,2 mm	$10^2$ à $10^4$ /g	5 à 20

<sup>1</sup> Par gramme (/g) ou par mètre carré (/m<sup>2</sup>) de sol

<sup>2</sup> Gramme de biomasse par mètre carré (g/m<sup>2</sup>) de sol

### I6265 6 Le pH

L'acidité, exprimée par le pH, est définie par la concentration d'ions  $H^+$  qui sont fixés sur le CAH ou en mouvement dans la solution du sol. L'alcalinisation d'un sol se traduit généralement, pour les colloïdes négatifs, par une augmentation des charges négatives ce qui tend à accroître la CEC. Inversement, l'acidification du sol se traduit par une diminution de la CEC du sol (Gobat *et al.* 2010).

## **I 6 3 6 Les organismes vivants du sol**

### I6361 6 Diversité des êtres vivants

Le sol héberge une grande diversité d'organismes vivants qui sont usuellement classés selon leur taille. Deux grandes catégories sont distinguées : la faune et la microflore et sont elles-mêmes subdivisées en plusieurs classes.

La faune du sol (Bachelier and Bachelier 1963) est divisée en 4 groupes : la mégafaune, la macrofaune, la mésofaune et la microfaune. La mégafaune regroupe les animaux vertébrés dont la taille dépasse 80 mm (Lavelle and Spain 2001; Gobat *et al.* 2010). La macrofaune désigne l'ensemble des organismes dont la taille est comprise entre 4 et 80 mm. Ses représentants principaux sont les lombrics, les insectes, les macroarthropodes et les gastéropodes (Lavelle and Spain 2001; Gobat *et al.* 2010). La mésofaune inclut les organismes dont la longueur varie entre 0,2 et 4 mm. Cette catégorie comprend principalement les microarthropodes (acariens, collemboles) et les enchystréides (Lavelle and Spain 2001; Gobat *et al.* 2010). La microfaune est constituée d'invertébrés mesurant moins de 0,2 mm. Les protozoaires et les nématodes constituent l'essentiel de la microfaune. Ces organismes vivent dans les pores à l'extérieur des microagrégats au contact de l'eau liée et l'eau interstitielle (Lavelle and Spain 2001; Gobat *et al.* 2010). Le nombre d'espèces et l'abondance de la microfaune, mésofaune et macrofaune sont précisées dans le tableau I-3 (Chaussod *et al.* 1996).

La microflore désigne l'ensemble des microorganismes du sol et inclut les virus (Williamson *et al.* 2005; Fierer *et al.* 2007), les bactéries (Torsvik *et al.* 1990; Fierer *et al.* 2007), les champignons (Thorn *et al.* 1997; Fierer *et al.* 2007), les algues (Bond and Harris 1964) et les archae (Bintrim *et al.* 1997; Fierer *et al.* 2007). Seules les bactéries, les champignons et les algues sont représentés dans le tableau I-3 car ce sont les microorganismes

les plus étudiés dans le sol. Le groupe de microorganismes le plus abondant et le plus diversifié dans le sol est les bactéries (Torsvik *et al.* 1990; Fierer *et al.* 2007).

Tous ces organismes jouent un rôle primordial dans la formation des sols et leur évolution. La faune du sol participe à l'amélioration de la structure du sol (brassage des horizons, aération, drainage, formation des agrégats), à la fragmentation et à l'enfouissement de la matière organique (Gobat *et al.* 2010). La microflore du sol assure la dégradation complète de la matière organique et la formation de l'humus. Ces organismes remplissent également des fonctions environnementales essentielles en participant aux grands cycles biogéochimiques qui se déroulent dans le sol : cycle du carbone, de l'azote, du soufre, du fer et du phosphore (Gobat *et al.* 2010).

#### 16362 6 La microflore bactérienne

Parmi toute la microflore qui compose le sol, les bactéries constituent le groupe le plus abondant et le plus diversifié. En se basant sur la taille du génome de *E. coli* comme référence, Torsvik *et al.* (1996) ont estimé la présence d'environ 6000 génomes bactériens différents par gramme de sol (Torsvik *et al.* 1996). A titre d'exemple, la biomasse microbienne dans un sol de prairie s'élève à environ 1 à 2 tonnes.ha<sup>-1</sup> (Killham 1994).

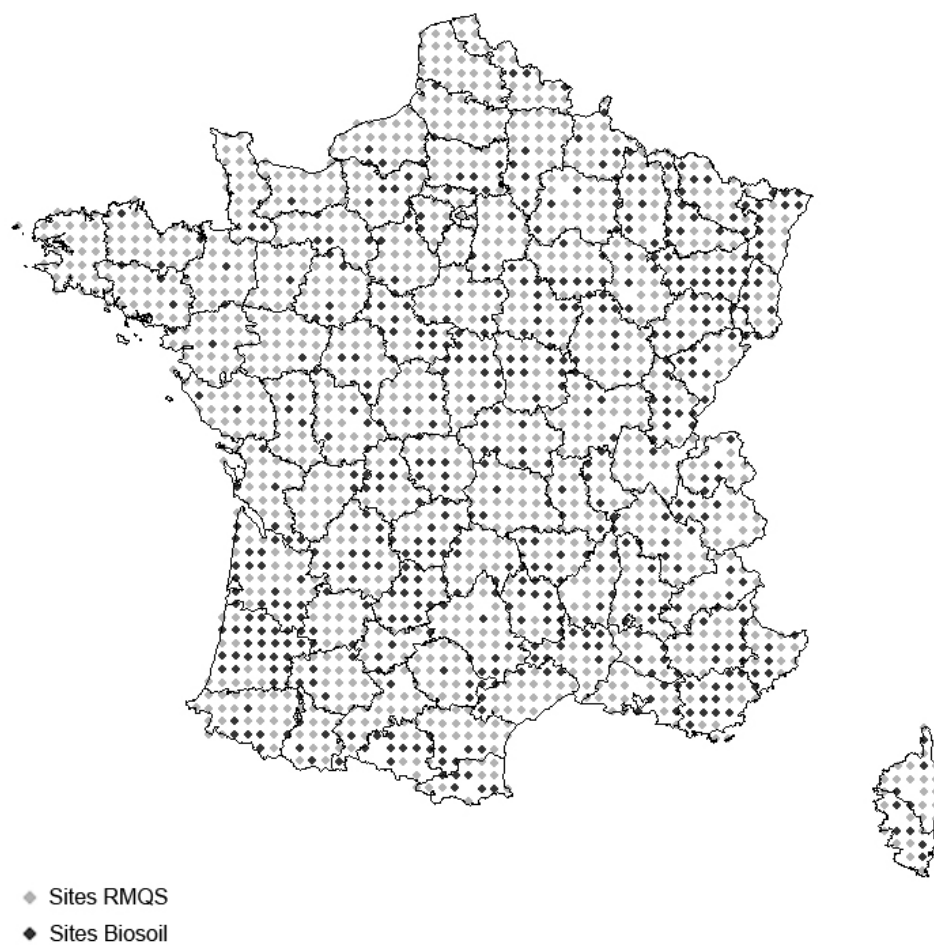
Le sol est une matrice hétérogène et complexe due à son organisation structurale en agrégats qui diffèrent en taille, forme et stabilité. De ce fait, le sol est considéré comme une mosaïque de microhabitats pour les communautés bactériennes. L'hétérogénéité de la structure du sol conduit à une distribution hétéroclite de la densité, de la diversité et de l'activité des communautés bactériennes (Foster 1988; Ranjard and Richaume 2001). La variabilité de la distribution spatiale des populations bactériennes a été décrite à une échelle allant de quelques millimètres à plusieurs mètres.

Dans le sol, la majorité des bactéries (80% à 90%) est fixée sur la surface des particules plutôt que libres dans la solution du sol (Corpe 1970). Plus précisément, les bactéries peuvent être localisées soit dans les pores à l'intérieur des agrégats du sol, soit adsorbées sur les particules d'argile (Foster 1988; Grundmann 2004). Le premier niveau de stratification spatiale des communautés bactériennes est observé au niveau des microagrégats et macroagrégats du sol. Plus de 80 % des bactéries telluriques sont localisés dans la partie interne des microagrégats, et plus exactement, dans les micropores de diamètre inférieur à 6 µm (Foster 1988; Hattori 1988; Ranjard *et al.* 1997). Le diamètre moyen des pores principalement colonisés par les bactéries est d'environ 2 µm et aucune bactérie ne peut être

observée dans les pores de diamètre inférieur à 0,8  $\mu\text{m}$  (Kilbertus 1980). Le diamètre maximum des pores les plus fréquemment colonisés par les bactéries est estimé à 2,5  $\mu\text{m}$  pour les sols à texture fine, ou 9  $\mu\text{m}$ , pour les sols à texture grossière (Ranjard *et al.* 2000; Ranjard and Richaume 2001). La localisation des bactéries dans les pores des microagrégats les protège des phénomènes de prédation en les rendant inaccessibles aux protozoaires (Rutherford and Juma 1992). Les micropores permettent une rétention d'eau supérieure aux macropores des agrégats et offrent une meilleure protection contre les phénomènes de dessiccation (Ranjard and Richaume 2001). La distribution et la composition des communautés bactériennes varient également à grande échelle (Dequiedt *et al.* 2011). Des facteurs comme le type de sol (Girvan *et al.* 2003), le mode d'occupation du sol (Nsabimana *et al.* 2004), le pH (Lauber *et al.* 2009), la présence de matière organique (Wallenius *et al.* 2011) ou de polluants (Sullivan *et al.* 2013) vont influencer la distribution et la composition des communautés bactériennes (Hartman *et al.* 2008; Dequiedt *et al.* 2011). Le pH apparaît être un des principaux facteurs prédictifs de la diversité et la structure des communautés microbiennes (Fierer and Jackson 2006; Lauber *et al.* 2009). La richesse et la diversité des communautés sont plus grandes pour des pH proches de la neutralité et diminuent pour des pH inférieurs à 4,5 et supérieurs à 8 (Lauber *et al.* 2009).

#### **I 6 4 6 Le réseau de surveillance de la qualité des sols en France**

Les sols évoluent constamment sous l'effet de grands facteurs naturels et sous l'effet des activités humaines (usages, aménagements fonciers, pratiques agricoles, épandages de boues, retombées atmosphériques, pollutions accidentelles, ...). Ces évolutions d'origine anthropique sont, la plupart du temps, préjudiciables au maintien de la qualité des sols. Elles sont le résultat de processus longs et cumulatifs, difficilement détectables et dont certains sont parfois irréversibles à l'échelle de temps humaine. Il s'avère, par conséquent, nécessaire de détecter de façon précoce l'apparition et les tendances de ces évolutions, à l'aide de programmes d'observation et de suivi de la qualité des sols. Pour répondre à cette attente, un réseau de sites, dit « Réseau de Mesures de la Qualité des Sols » (RMQS) est mis en place sur le territoire français depuis 2001. Ce réseau constitue un cadre national pour l'observation de l'évolution de la qualité des sols. Le Réseau de Mesures de la Qualité des Sols est une opération pilotée par le Groupement d'Intérêt Scientifique Sol (Gis Sol). La responsabilité de



**Figure I-5. Répartition des sites RMQS et des sites Biosoil sur le territoire français.**



la coordination, de la mise en place et du suivi du RMQS a été confiée par le Gis Sol à l'Unité Infosol de l'INRA d'Orléans.

Le réseau repose sur le suivi de 2200 sites répartis uniformément sur le territoire français, selon une maille carrée de 16 km de côté, calée sur le Réseau Européen de Suivi des Dommages Forestiers (Santé des Forêts, ICP-Forest niveau I). Un ensemble de 1640 sites s'ajoute donc aux 540 sites du réseau forestier (= site Biosoil) préexistant pour former le RMQS (Figure I-5). Cette configuration a été choisie afin que ce réseau couvre la plupart des combinaisons sol-occupation rencontrées en France. La première campagne de prélèvement des sols a commencé en 2001 et sera reconduite, *a priori*, tous les dix ans.

La totalité des échantillons de sols prélevés sur les sites du RMQS est archivée au conservatoire d'échantillons de sols localisé à l'INRA d'Orléans. Pour chaque sol, les paramètres physico-chimiques ont été analysés (composition granulométrique, teneur en ions totale ou échangeable). En supplément, des informations relatives à la météo locale du lieu de prélèvement (température, précipitation..), au mode d'occupation du sol (prairie, culture, forêt..) et au type d'amendement appliqué (nature, fréquence) sont disponibles.

## **II 6 Choix et description des bactéries pathogènes modèles**

---

### **II - 1 6 Les bactéries pathogènes dans le sol**

Au sein des communautés microbiennes du sol, certains microorganismes peuvent se révéler pathogènes pour les animaux et l'homme. Le sol est un habitat naturel pour certaines bactéries pathogènes primaires et opportunistes. Les bactéries opportunistes telles que *Burkholderia* spp., *Ochrobactrum* spp. et *Stenotrophomonas* spp. sont présentes dans la rhizosphère (Berg *et al.* 2005). *Pseudomonas aeruginosa* est aussi rencontrée dans les sols (Colinon *et al.* 2013). Les bactéries pathogènes primaires du genre *Bacillus*, telles que *Bacillus cereus* et *Bacillus anthracis* sont des habitants naturels du sol et sont à l'origine de graves maladies chez l'homme (intoxications alimentaires et pneumonie) (Ticknor *et al.* 2001; Granum 2005). *Clostridium botulinum* et *Clostridium tetani* sont également des bactéries telluriques hautement pathogènes de l'homme (Smith 1978; Smith 1979). *Listeria*

*monocytogenes* est également une bactérie pathogène qui a une vie saprophyte dans le sol (Freitag *et al.* 2009).

De plus, les sols, soumis à des actions anthropiques (agriculture, industrie, urbanisation), peuvent voir la composition de leurs communautés bactériennes modifiée. En agriculture, le recyclage de produits résiduels organiques (fumiers, lisiers, boues de station d'épuration) comme fertilisants des sols peut introduire dans ceux-ci des bactéries potentiellement pathogènes de l'homme telles que *Salmonella* spp., *Escherichia coli* et *L. monocytogenes*. Le sol est l'unique support des productions végétales composant l'alimentation humaine. La présence de bactéries pathogènes dans le sol peut altérer la qualité des productions et avoir de graves répercussions sur la santé humaine.

## II 6 2 6 Sélection des bactéries pathogènes

Parmi toutes les bactéries pathogènes qui peuvent être présentes dans le sol, 4 modèles bactériens ont été choisis pour décrire, dans la suite de cette partie bibliographique, l'effet des paramètres édaphiques sur la survie des pathogènes dans le sol. Ces 4 modèles bactériens ont été choisis en fonction de leur importance dans le domaine de la santé et de leur incidence dans les maladies infectieuses d'origine alimentaire. Depuis 5 ans, *Salmonella* est classée comme le 2<sup>nd</sup> agent responsable d'infections d'origine alimentaire au sein de l'union européenne (EFSA 2011), notamment en France (Jourdan-Da Silva and Le Hello 2010) et aux Etats Unis (Mead *et al.* 1999). Aux Etats Unis, *Salmonella* spp. est l'agent qui provoque le plus fort taux d'hospitalisation et aboutit au plus fort taux de mortalité (Scallan *et al.* 2011). *L. monocytogenes* est également une bactérie pathogène qui entraîne de forts taux de mortalité parmi les personnes infectées mais l'incidence de la listériose est plus faible que l'incidence des salmonelloses (EFSA 2011; Goulet *et al.* 2012). *Salmonella* spp. et *L. monocytogenes* sont toutes 2 des bactéries pathogènes primaires c'est-à-dire qu'elles induisent une maladie spécifique (salmonellose et listériose) après infection d'un hôte immunocompétent. Ces 2 maladies se manifestent par une gastroentérite chez les hôtes sains mais les symptômes peuvent être plus graves (septicémies, méningites) chez les personnes immunodéprimées (Sindic 2002).

Deux autres bactéries ont été ciblées : *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli*. Ces 2 bactéries ont été choisies car ce sont 2 pathogènes opportunistes. Contrairement aux

pathogènes primaires, *E. faecalis* et *E. coli* font partie de la flore intestinale des individus et sont inoffensives chez un sujet sain. En revanche, chez un sujet immunodéprimé, elles peuvent induire une infection dont les symptômes sont variés et non spécifiques de la bactérie (Sindic 2002). Ces 2 bactéries sont également des indicateurs sanitaires recherchés principalement pour évaluer la qualité de l'eau.

### II.6.1.6 *Salmonella* spp.

#### ▪ Caractéristiques du genre *Salmonella*

Le genre *Salmonella* fait partie de la grande famille des *Enterobacteriaceae*. Controversée, la classification taxonomique et la nomenclature du genre *Salmonella* a évolué au cours du temps pour finalement être divisée en 2 espèces : *S. bongori* et *S. enterica* (Reeves *et al.* 1989; Tindall *et al.* 2005). *Salmonella enterica* est elle-même composée de 6 sous-espèces : *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* et *indica* (Brenner *et al.* 2000). Toutes les bactéries du genre *Salmonella* possèdent à leur surface 3 types d'antigènes : l'antigène somatique O (localisé dans la paroi), l'antigène flagellaire H et l'antigène de virulence Vi (localisé dans la capsule) (Grimont *et al.* 2000). Ces antigènes sont mis en évidence par sérotypage grâce à leurs propriétés agglutinantes. La diversité et la combinaison de ces 3 antigènes à la surface des cellules permettent de différencier plus de 2500 sérotypes de *Salmonella* au sein de chacune des sous-espèces de *Salmonella enterica* et au sein de l'espèce *Salmonella bongori* (Grimont and Weill 2007 ).

Le genre *Salmonella* répond à des caractéristiques générales communes à la famille des Entérobactéries. En microscopie optique, les salmonelles sont caractérisées par de petits bacilles à Gram négatif (2 et 5 µm de longueur sur 0,7 à 1,5 µm de largeur), non sporulés, qui, excepté le sérovar Gallinarum, sont mobiles grâce à une ciliature péritriche. Ce sont des bactéries aéro-anaérobies qui réduisent les nitrates en nitrites, peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone, fermentent le glucose mais pas le lactose ni le sucrose et produisent du gaz à partir du glucose (sauf *Salmonella Typhi*). Le test oxydase est toujours négatif. Le genre *Salmonella* peut être identifié au sein des Entérobactéries par l'absence de certaines enzymes : uréase, tryptophanase, tryptophane désaminase et -galactosidase (Grimont *et al.* 2000; Korsak *et al.* 2004).

- Habitats et réservoirs du genre *Salmonella*

Le réservoir principal de *Salmonella* spp. est constitué par le tractus gastro-intestinal des mammifères et des oiseaux mais certaines souches peuvent également être isolées des animaux à sang froid et des animaux aquatiques (Scherer and Miller 2001). Les salmonelles sont isolées à la fois des hommes et des animaux infectés mais également des individus sains. Le réservoir animal constitue la principale source de propagation des salmonelles dans l'environnement. Les salmonelles présentes dans les matières fécales des animaux peuvent contaminer le sol des pâturages, le sol des cultures après épandage et l'eau (Baudart *et al.* 2000; Winfield and Groisman 2003; Jacobsen and Bech 2012). Les salmonelles peuvent être retrouvées dans les aliments d'origine animale (viande, lait, œuf) ainsi que les produits frais (fruits et légumes).

- Pathogénicité des bactéries du genre *Salmonella* et épidémiologie

La spécificité d'adaptation vis à vis d'une espèce cible varie entre les différents sérovars de Salmonelles et conditionne la pathogénicité pour les hommes et les animaux. Les sérovars *S. Typhi* et *S. Paratyphi* sont particulièrement adaptés à l'homme et déclenchent de sévères fièvres entériques mais ne sont pas pathogènes pour les animaux. Certains sérovars sont ubiquitaires, tels que *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium*, et peuvent affecter les hommes et les animaux et provoquer des troubles gastro-intestinaux moins sévères que les fièvres entériques. D'autres sérovars comme *S. Abortus-ovis* (mouton) et *S. Gallinarum* (volaille) sont plus spécifiques d'une espèce animale. Les sérovars *S. Choleraesuis* (porc) et *S. Dublin* (bovin) initialement pathogènes pour les animaux ont cependant déjà été impliqués dans des cas d'infections humaines (Velge *et al.* 2005).

*S. Typhi* et *S. Paratyphi* sont rarement transmis par la voie alimentaire contrairement aux autres sérovars et sont contractés lors d'un séjour en zone d'endémie, principalement en Afrique et dans le continent indien (Velge *et al.* 2005). En France, les cas de fièvres typhoïdes et paratyphoïdes font l'objet d'une déclaration obligatoire (Jourdan-Da Silva and Le Hello 2010). Les tendances épidémiologiques de *Salmonella* sont dominées par les sérovars non typhoïdiens et sont semblables entre pays industrialisés (Velge *et al.* 2005; EFSA 2011). En 2001, Aux Etats Unis, 60% des cas de salmonellose étaient dus à 4 sérovars : *S. Typhimurium* (22,1%), *S. Enteritidis* (17,7%), *S. Newport* (10%) and *S. Heidelberg* (5,9%) (Velge *et al.* 2005). Ces sérovars étaient également dominants dans les cas de salmonelloses recensées aux

Etats Unis de 1987 à 1997 (Olsen *et al.* 2001). Au niveau Européen, *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* sont les 2 sérovars les plus fréquemment incriminés dans les cas de salmonelloses humaines en 2009 (EFSA 2011). Le taux de mortalité reporté au niveau européen en 2009 était de 0,08% parmi les 53 167 cas confirmés de salmonelloses qui ont été signalés (EFSA 2011). En France, les gastro-entérites provoquées par les salmonelles ne sont pas déclarées sauf s'il s'agit de cas groupés lors d'une toxi-infection alimentaire collective (Tiac) (Jourdan-Da Silva and Le Hello 2010). En 2010, 92 Tiac confirmées à *Salmonella* ont été déclarées, représentant environ 40% des foyers de Tiac dont l'agent étiologique a été confirmé. Ces Tiac à *Salmonella* ont été à l'origine de 1 066 malades et 145 hospitalisations (Jourdan-Da Silva and Le Hello 2010). En France, les deux principaux sérovars isolés de 2002 à 2010 en santé humaine sont également *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis* (Jourdan-Da Silva and Le Hello 2010).

## IIó 2ó 2 ó *Listeria monocytogenes*

### ▪ Caractéristiques du genre *Listeria*

Le genre *Listeria* rassemble 8 espèces : *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. marthii* et *L. rocourtiae* (Rocourt 1999; Graves *et al.* 2010; Leclercq *et al.* 2010). Le genre *Listeria* a fait l'objet de plusieurs classifications et appartient désormais à la branche phylogénique des *Clostridia* comme les genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Bronchothrix* (Rocourt 1988; Rocourt 1999). Les bactéries du genre *Listeria* sont de petits bacilles (1 à 2 µm de long et 0,5 µm de diamètre) à Gram positif non sporulés et non capsulés. Grâce à un système flagellaire pérित्रиче, ces bactéries sont mobiles entre 20°C et 25°C mais à partir de 37°C, leur mobilité est très réduite. Elles sont microaérophiles, oxydase négative et catalase positive. Ce sont des bactéries psychrotrophes qui peuvent se développer entre -2°C et 45°C, cependant leur température optimale de croissance se situe entre 30°C et 37°C (Rocourt 1999; Bornert 2000). Toutes les espèces de *Listeria* sont phénotypiquement similaires mais elles peuvent être différenciées par des propriétés biochimiques basées sur la production d'acide à partir du D-xylose, L-rhamnose et alpha méthyl D mannoside (Gray 1966; Allerberger 2003). Les souches de *Listeria* possèdent à leur surface des déterminants antigéniques au niveau de leur paroi (antigène O) et de leurs flagelles (antigène H). La combinaison unique de ces antigènes permet de différencier *L. monocytogenes* des autres espèces de *Listeria*. Ce test sérologique permet également de

différencier les souches de *L. monocytogenes* qui peuvent appartenir à 12 sérotypes différents (Liu 2006).

- Habitats et réservoirs de *L. monocytogenes*

*L. monocytogenes* peut coloniser le tractus intestinal des hommes et des animaux malades mais également des individus sains (Esteban *et al.* 2009). Le portage asymptomatique du pathogène a été observé chez 2 à 6% de la population humaine (Meng and Doyle 1998; Grif *et al.* 2003). Elle est donc également excrétée dans les fèces et peut se retrouver dans les boues et les effluents de stations d'épuration (Müller 1990; Garrec *et al.* 2003; Nightingale *et al.* 2004; Paillard *et al.* 2005). Elle a été isolée d'une large gamme de produits alimentaires tels que des produits laitiers, des produits carnés, du poisson, des légumes, (Farber and Peterkin 1991; Beuchat 1996). C'est une bactérie ubiquitaire, largement présente dans l'environnement, qui est fréquemment isolée à partir de végétation, du sol, de l'eau et des sédiments (Welshimer 1960; 1968; Welshimer and Donker-Voet 1971; Weis and Seeliger 1975; Welshimer 1975; Colburn *et al.* 1990; Lyautey *et al.* 2007). La large distribution de *L. monocytogenes* dans l'environnement favorise la contamination fréquente des denrées alimentaires à différentes phases de la production, de la transformation, du conditionnement et de la distribution.

- Pathogénicité de *L. monocytogenes* et épidémiologie

Parmi les 8 espèces de *Listeria*, deux seulement sont potentiellement pathogènes. *Listeria ivanovii* ne provoque des infections que chez les espèces animales et n'est pas pathogène pour l'homme. En revanche, un intérêt particulier est porté à *Listeria monocytogenes* qui est l'agent de la listériose, maladie affectant aussi bien les hommes que les animaux (Hof and Hefner 1988; Low and Donachie 1997a; Vazquez-Boland *et al.* 2001). *L. monocytogenes* est considéré comme un pathogène opportuniste car cette bactérie touche principalement les sujets dont les défenses immunitaires sont compromises : personnes âgées, femmes enceintes, personnes hospitalisées, traitements immunosuppresseurs. La listériose peut se manifester sous différentes formes chez l'homme telles que des gastro-entérites, des septicémies, des méningites, des infections périnatales et des cas d'avortement (Gray 1966). La pathogénicité de *L. monocytogenes* est due à sa capacité de pénétrer et de se multiplier dans les cellules de l'épithélium intestinal, de gagner les vaisseaux lymphatiques et les

vaisseaux sanguins afin de se disséminer dans les différents tissus de l'hôte (Vazquez-Boland *et al.* 2001). *L. monocytogenes* possède une batterie de facteurs de virulence (internalines, hémolysines, phospholipases) qui contrôlent les étapes clés de son cycle de vie de parasite intracellulaire (Farber and Peterkin 1991; Vazquez-Boland *et al.* 2001). Cependant, la virulence de *L. monocytogenes* peut varier entre les souches. En effet, seulement 3 des 12 sérotypes connus de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b et 4b) représentent plus de 90% des cas de listérioses humaines et animales (Vazquez-Boland *et al.* 2001).

En France, la listériose est une maladie à déclaration obligatoire. L'incidence de cette maladie a diminué de 1987 à 2001, mais après une stabilisation du nombre de cas jusqu'en 2005, elle augmente légèrement. En 2011, 282 cas ont été déclarés dans la France entière dont 35 cas de forme materno-néonatale et 247 cas de forme bactériémique, localisée et méningée. Le taux de mortalité pour ces 2 formes atteint 26% et 20% des cas déclarés respectivement (Goulet *et al.* 2012).

## II.6.3.6 *Escherichia coli*

### ▪ Caractéristiques du genre *Escherichia*

Le genre *Escherichia* appartient à la grande famille des *Enterobacteriaceae*. Pendant longtemps, le genre *Escherichia* ne renfermait que l'espèce *E. coli*, à laquelle sont venues s'ajouter les espèces *E. blattae*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. fergusonii*. Les bactéries du genre *Escherichia* sont des bacilles à Gram-négatif dont la taille varie de 0,3 à 1 µm de diamètre sur 1 à 6 µm de long en fonction des conditions de croissance. Ce sont des bactéries aéro-anaérobies, oxydase négative, catalase positive, nitrate réductase positive et qui possèdent à la fois un métabolisme respiratoire et fermentatif. Les bactéries du genre *Escherichia* sont non sporulées, parfois capsulées et peuvent être mobiles grâce à une ciliature péritriche. Les espèces du genre *Escherichia* peuvent être différenciées les unes des autres par des caractéristiques biochimiques spécifiques basées sur la dégradation de multiples sources de carbone. Parmi toutes les espèces du genre *Escherichia*, c'est *E. coli* qui est la plus étudiée dans la littérature (Grimont 1987).

▪ Habitats et réservoirs de *E. coli*

*E. coli* est une bactérie commensale du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Elle représente à elle seule l'espèce dominante (80-90%) de la flore bactérienne aérobie de l'intestin de l'homme à raison de  $10^7$  à  $10^9$  UFC par gramme de fèces (Tenaillon *et al.* 2010). De par sa forte prévalence dans les intestins, *E. coli* se retrouve disséminée dans l'environnement *via* les excréments humains, les déjections animales et toutes sortes de déchets humains. *E. coli* est fréquemment rencontrée dans les amendements organiques d'origine animale et les eaux usées (Shannon *et al.* 2007; Klein *et al.* 2010a). Cette bactérie peut également être présente dans les aquifères, les cours d'eau, les sédiments et le sol (Solo-Gabriele *et al.* 2000; An *et al.* 2002; Byappanahalli *et al.* 2006). Certains types d'aliments peuvent être contaminés par *E. coli*. Dans tous les cas, sa présence dans un milieu autre que le tractus intestinal est considérée comme une indication de contamination fécale et, dès lors, indique la présence possible de microorganismes pathogènes d'origine fécale.

▪ Pathogénicité et épidémiologie

Bien que la majorité des souches de *E. coli* soit des commensales du tube digestif des hommes et des animaux, certaines souches sont pathogènes pour l'homme. Ces souches sont à la fois responsables d'infections intestinales et d'infections extra-intestinales (infections urinaires, bactériémies, méningites...). Toutes les souches de *E. coli* pathogènes sont capables de persister et de se multiplier dans le tractus digestif en contournant les défenses immunitaires de l'hôte. Néanmoins, ces souches ont développé différents modes d'interaction avec leur hôte se traduisant par des signes cliniques variés. Ainsi, en médecine humaine, sur la base de ces modes d'interaction hôte - bactérie et des signes cliniques de l'infection, les souches de *E. coli* pathogènes sont classées en « pathovars » ou « pathotypes » qui regroupent des souches de sérotypes spécifiques. Actuellement, les souches impliquées dans des infections intestinales chez l'homme sont classées en six pathotypes : les EPEC (pour «*E. coli* Enteropathogènes», premier pathotype décrit historiquement), les EHEC («*E. coli* Entérohémorragiques»), les ETEC («*E. coli* Entérotoxinogènes»), les EIEC («*E. coli* Entéroinvasifs»), les EAEC («*E. coli* Entéroaggrégatifs») et les DAEC («*E. coli* à adhésion diffuse»). Outre ces pathovars responsables d'infections intestinales, d'autres pathovars sont à l'origine d'infections extra-intestinales, comme les UPEC (pour «Uropathogenic *E. coli*»), responsables d'infections du tractus urinaire, les *E. coli* associés à des méningites (MNEC pour «Meningitis-associated *E. coli*») ou à des septicémies. Ces souches ont récemment été



regroupées sous le terme de ExPEC (pour «Extra-intestinal pathogenic *E. coli*») (Russo and Johnson 2000).

#### IIó 2ó 4 ó *Enterococcus faecalis*

##### ▪ Caractéristiques du genre *Enterococcus*

Jusqu'en 1984, *E. faecalis* et *E. faecium* alors nommés *Streptococcus faecalis* et *S. faecium* étaient classés au sein du genre *Streptococcus* (groupe D). Suite à des études basées sur l'homologie des séquences de l'ARN 16S, des différences distinctes ont été mises en évidence entre ces 2 bactéries et la majorité des autres espèces du genre *Streptococcus* (Farrow *et al.* 1983; Collins *et al.* 1984). *S. faecalis* et *S. faecium* sont alors classés dans le genre *Enterococcus* qui rassemble actuellement 28 espèces (Devriese *et al.* 1993; Foulquié Moreno *et al.* 2006). Le genre *Enterococcus* est caractérisé par des coques à Gram positif, non capsulés et non sporulés. Ces bactéries sont catalase négative, oxydase négative. La température optimale de croissance est 35 °C mais la plupart des espèces peut se développer entre 10°C et 45°C (Boutibonnes *et al.* 1993). Ils peuvent croître dans un milieu en présence de 6,5% de NaCl, 40% de sels biliaires et 0,1% de bleu de méthylène à un pH de 9,6. Pour *E. faecalis* en particulier, de nombreux rapports décrivent sa capacité à résister à de fortes températures, à une osmolarité élevée, à la présence d'éthanol, de détergents, de peroxyde d'hydrogène, d'hypochlorite de sodium et de métaux lourds (Flahaut *et al.* 1996; Flahaut *et al.* 1998; Rincé *et al.* 2001; Benachour *et al.* 2005).

##### ▪ Habitats et réservoirs de *E. faecalis*

Comme tous les Entérocoques, *E. faecalis* est un commensal de l'intestin des hommes et des animaux à sang chaud. *E. faecalis* est l'espèce de *Enterococcus* majoritaire dans les excréments humains et est retrouvé à des concentrations variant de 10<sup>5</sup> à 10<sup>7</sup> par gramme de fèces (Noble 1978; Leclerc *et al.* 1996). Dans une proportion moindre, *E. faecalis* est retrouvé dans les fèces des animaux tels que les bovins, les volailles, les porcs et les moutons (Leclerc *et al.* 1996; Franz *et al.* 1999; Wheeler *et al.* 2002). *E. faecalis* est donc retrouvé dans les eaux usées et les boues de station d'épuration ainsi que les amendements organiques (Kühn *et al.* 2003; Da Silva *et al.* 2006; Hölzel *et al.* 2010). *E. faecalis* est ubiquitaire dans l'environnement et peut être isolé de milieux aquatiques comme les lacs et les rivières ainsi

que les sédiments (Fujioka *et al.* 1998; Byappanahalli *et al.* 2012a; Byappanahalli *et al.* 2012b; Ran *et al.* 2013). Cette bactérie est fréquemment retrouvée dans le sol et sur les végétaux (Mundt 1961; Fujioka *et al.* 1998; Byappanahalli *et al.* 2012b; Valenzuela *et al.* 2012; Ran *et al.* 2013). De par sa présence naturelle dans les intestins et les fèces, *E. faecalis* et plus globalement les Entérocoques, sont des indicateurs de contamination fécale dans les échantillons d'eau de baignade ou d'eau potable principalement (USEPA 2004). Les aliments d'origine animale tels que la viande et les produits laitiers peuvent être contaminés par *E. faecalis* porté par les animaux eux-mêmes (Franz *et al.* 1999; Giraffa 2002; Franz *et al.* 2003).

▪ Pathogénicité d'*E. faecalis* et épidémiologie

*E. faecalis* mais également *E. faecium* sont les 2 espèces d'entérocoques les plus souvent associées aux pathologies humaines. *E. faecalis* émerge actuellement en tant que pathogène opportuniste, n'affectant que les individus présentant un système immunitaire affaibli, notamment dans les milieux hospitaliers (Morrison *et al.* 1997). Il peut provoquer des endocardites, des bactériémies, des méningites, des infections urinaires, des infections intra-abdominales et des infections de plaies chirurgicales (Chenoweth and Schaberg 1990; Jett *et al.* 1994). La pathogénicité d'*E. faecalis* est liée à l'expression de facteurs de virulence ainsi qu'à la résistance à de nombreux antibiotiques. Une partie des facteurs de virulence d'*E. faecalis* sont des protéines membranaires (adhésines, substances d'agrégation) qui lui permettent d'adhérer aux cellules hôtes et lui facilitent l'invasion des tissus. En addition, *E. faecalis* sécrète des substances (cytolisines, protéases, toxines) qui lui permettent de moduler la réponse immunitaire et inflammatoire de l'hôte et de causer des dommages tissulaires par l'intermédiaire de toxines (Jett *et al.* 1994; Fisher and Phillips 2009). Les souches d'*E. faecalis* isolées de différentes sources (cas cliniques, individus sains, environnement) possèdent toutes au moins un facteur de virulence. Cependant, les facteurs de virulence sont présents dans une proportion et une combinaison différentes entre les souches et selon leur origine (Duprè *et al.* 2003; Creti *et al.* 2004). Un autre facteur contribuant largement à la pathogénicité d'*E. faecalis* est sa résistance naturelle ou acquise à un large spectre d'antibiotiques (Murray 1990; Hegstad *et al.* 2010).

*E. faecalis* est l'espèce prédominante d'entérocoque (80% - 90%) impliquée dans les cas d'infection humaine (Murray 1990; Jett *et al.* 1994). En 2010 au Royaume Uni, les entérocoques étaient à l'origine de 5 397 cas de bactériémie dont 45% des cas étaient attribués

à l'espèce *E. faecalis* (HPA 2011). Si un patient contracte une souche d'entérocoque résistante à un antibiotique, les risques d'échec du traitement initial augmentent de 20% et la fréquence du décès augmente de 27% à 52% (Fisher and Phillips 2009).

### **III ó Pratiques agricoles et risque de transfert des bactéries pathogènes dans le sol**

---

Comme abordé dans le chapitre précédent, les 4 espèces bactériennes ciblées ont comme réservoir commun le tractus intestinal des hommes et des animaux. C'est principalement *via* les fèces que ces bactéries pathogènes vont être introduites dans le sol. L'excrétion naturelle des fèces par les animaux de rente ou l'application de fumier et de lisier sur les terres agricoles entraîne une contamination du sol par les matières fécales et représente une source d'introduction potentielle de bactéries pathogènes dans le sol. D'autres pratiques agricoles peuvent aboutir à l'introduction de bactéries pathogènes dans les sols. Les eaux usées ou traitées peuvent être utilisées pour irriguer les sols agricoles alors qu'elles peuvent contenir des bactéries pathogènes. Les boues de station d'épuration, fréquemment épandues sur les terres agricoles, peuvent également contenir des bactéries pathogènes initialement présentes dans les eaux usées, avant leur traitement.

#### **III ó 1 ó Les effluents d'élevage et matières fécales**

Les animaux d'élevage, sains ou malades, peuvent être porteurs d'une grande partie des bactéries pathogènes. *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*. et *E. coli* O157 peuvent être rencontrés dans les matières fécales animales. Les bactéries telles qu'*E. coli* non pathogène et *E. faecalis* sont également présentes dans les fèces et les effluents d'élevage en temps qu'hôtes du tractus digestif.

*L. monocytogenes* est retrouvé dans les excréments d'une grande variété d'espèces d'animaux sains (Gray 1966; Fenlon 1999). Les bovins semblent être l'espèce qui est la plus souvent porteuse de *L. monocytogenes*. Une forte incidence de *L. monocytogenes* a été notée dans les excréments de bovins (33%). Une incidence plus faible de *L. monocytogenes* apparaît pour les moutons (8%), les porcs (5,9%) et les chevaux (4,8%) (Wesley 1999). Une autre étude confirme cette tendance entre les différentes espèces d'animaux d'élevage (Esteban *et*

*al.* 2009). La prévalence de *L. monocytogenes* est supérieure dans les fèces de troupeaux de bovins à viande et à lait (30,6% et 46,3% respectivement) que dans les fèces de troupeaux de moutons (14,2%). En revanche, *L. monocytogenes* n'a pas été détecté dans les fèces des porcins (Esteban *et al.* 2009).

Les bactéries du genre *Salmonella* sont plus fréquemment rencontrées dans les fèces de poulets et de volailles (Guerin *et al.* 2005; Jiménez *et al.* 2011). L'incidence de *Salmonella* est de 39,6% dans les déjections de poulets contre 32% et 25% dans les déjections de bovins et de moutons (Jiménez *et al.* 2011). Une autre étude démontre que les fèces de porcs (23%) contiennent plus souvent *Salmonella* que les fèces de bovins (0,2%) et de moutons (0,1%) (Davies *et al.* 2004). La faible incidence de *Salmonella* dans les fèces de bovins, comme observée dans ces 2 articles, a été confirmée par une autre étude (Dargatz *et al.* 2003).

Les ruminants sains, principalement les bovins, sont porteurs d'*E. coli* O157:H7, et dans une moindre mesure, les moutons et les chèvres (Gyles 2007; La Ragione *et al.* 2009). Par exemple, une étude conduite sur 1 an indique qu'*E. coli* O157:H7 est retrouvé dans 15,7% des fèces de bovins, 2,2% des fèces de mouton, dans 0,4% des fèces de porcs mais est absent dans les fèces de volailles (Chapman *et al.* 1997). L'incidence d'*E. coli* O157:H7 est beaucoup plus faible dans une étude norvégienne, où moins de 0,2% des fèces de bovins, de porcs et de moutons sont positifs pour la détection d'*E. coli* O157:H7 (Johnsen *et al.* 2001).

L'incidence et les concentrations de ces bactéries pathogènes dans les fèces et les effluents d'élevage peuvent donc varier en fonction de l'espèce animale. D'autres facteurs relatifs au mode d'élevage et à la condition physique de l'animal peuvent jouer un rôle tels que : son âge, son régime alimentaire et la saison. L'effet de ces facteurs est particulièrement bien documenté pour les souches d'*E. coli* pathogènes. Le type d'aliment fourni aux animaux d'élevage peut indirectement influencer la présence et la concentration de bactéries pathogènes dans l'estomac et les fèces en modifiant la structure des communautés microbiennes ainsi que le pH rencontré dans le rumen (Russell and Rychlik 2001). L'alimentation à base de grains acidifie le pH du rumen et favorise la sélection de souches d'*E. coli* acido-résistantes. Une alimentation à base de fourrage de foin ou de mélasse diminue de manière significative la concentration d'*E. coli* et la concentration de gènes codant des facteurs de virulence des souches d'*E. coli* EHEC dans les fèces (Diez-Gonzalez *et al.* 1998; Gilbert *et al.* 2005). Les veaux sevrés et les génisses excrètent beaucoup plus d'*E. coli* O157 que les veaux non sevrés et les bovins adultes (Rugbjerg *et al.* 2003; Ferens and Hovde 2011).

**Tableau I-4. Incidences et concentrations (moyenne arithmétique) de bactéries pathogènes et d'indicateurs de contamination fécale dans des fumiers frais issus de plusieurs espèces animales.** (d'après Hutchison *et al.*, 2004 et Klein *et al.*, 2010)

Bactéries ciblées	Incidence (%)				Concentration UFC/g <sup>a</sup>			
	Bovins	Porcs	Volailles	Moutons	Bovins	Porcs	Volailles	Moutons
<i>E. faecalis</i> *	NR				1,5x10 <sup>6</sup>			
<i>E. coli</i> *	NR				6,3x10 <sup>6</sup>			
<i>E. coli</i> O157 <sup>°</sup>	13,2	11,9	ND	20,8	2,9x10 <sup>6</sup>	6,9x10 <sup>4</sup>	ND	1,1x10 <sup>4</sup>
<i>Salmonella</i> spp. <sup>°</sup>	7,7	7,9	17,9	8,3	3,9x10 <sup>4</sup>	9,6x10 <sup>3</sup>	5x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>
<i>S. enterica</i> *	6				2,5x10 <sup>3</sup>			
<i>Listeria</i> spp. <sup>°</sup>	29,8	19,8	19,4	29,2	1,5x10 <sup>4</sup>	4,6x10 <sup>4</sup>	3,2x10 <sup>4</sup>	4,5x10 <sup>2</sup>
<i>L. monocytogenes</i> *	31				5x10 <sup>3</sup>			

<sup>a</sup> : Moyenne arithmétique

NR : Non Renseigné

<sup>°</sup> D'après Hutchison *et al.*, 2004

\* D'après Klein *et al.*, 2010

En général, la prévalence d'*E. coli* O157 chez les bovins est la plus forte entre la fin du printemps et le début de l'automne (Edrington *et al.* 2006; Ferens and Hovde 2011).

Ces bactéries peuvent également être introduites dans le sol par l'application des effluents d'élevage sur les cultures. Les 3 types d'effluents d'élevage générés dans les fermes et susceptibles d'être épandus sont le fumier (mélange de litière, d'urine et d'excréments d'animaux), le lisier (mélange d'excréments d'animaux purs, d'urine et d'eau de lavage) et le purin (jus d'écoulement des fumiers, constitué surtout d'urine, diluée ou non) (Toussaint and Dehareng). Deux études menées en Australie et en Grande-Bretagne ont évalué l'incidence et la concentration de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. dont *L. monocytogenes*, *E. coli* pathogène ou non et *E. faecalis* dans un grand nombre de fumiers (Hutchison *et al.* 2004a; Klein *et al.* 2010a). Dans ces 2 études, la majorité des fumiers testés sont contaminés avec au moins un de ces pathogènes. Le tableau I-4 présente l'incidence et la concentration de quelques pathogènes dans des fumiers frais de bovins (Klein *et al.* 2010a), de porcs, de volailles et de moutons (Hutchison *et al.* 2004a).

### III 6 2 6 Les boues de station d'épuration

Les boues de station d'épuration sont des sédiments résiduels issus du traitement des eaux usées domestiques et industrielles en station d'épuration (Lepeuple *et al.* 2004). Chaque année, environ 10 millions de tonnes de produit brut, soit 1 million de tonnes de matières sèches de boues de station d'épuration sont produites en France. Ce sont à 52% des boues industrielles et à 48% des boues urbaines (Observation et statistiques, Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie). Trois types de traitements peuvent être appliqués aux boues brutes (initialement liquides) afin de réduire (i) la teneur en matière organique fermentescible (stabilisation) (ii) la teneur en eau (iii) et la charge en microorganismes pathogènes (hygiénisation) (Arthurson 2008). Les boues d'épuration sont considérées comme des déchets et peuvent être éliminées par incinération mais elles peuvent également être valorisées par épandage sur les sols agricoles (Lepeuple *et al.* 2004). L'épandage permet de recycler une partie des boues et de profiter de leurs propriétés fertilisantes, en bouclant le cycle de la matière organique par retour vers le sol (Les boues d'épuration municipales et leur utilisation en agriculture, Comité national des boues). Cette pratique est strictement encadrée du point de vue sanitaire et environnemental. Il faut en effet s'assurer, d'une part, de l'aptitude des sols à remplir cette fonction environnementale de recyclage et d'autre part, de l'innocuité

**Tableau I-5. Seuils de références pour les teneurs en micro-organismes pathogènes dans les boues hygiénisées** (suivant l'arrêté du 8 janvier 1998 relatif aux épandages de boues sur les sols agricoles).

Salmonelles	Entérovirus	œufs d'helminthes pathogènes viables
< 8 NPP /10 g MS	< 3 NPPUC /10 g MS	< 3 /10 g MS

NPP : Nombre le Plus Probable,

NPPUC : Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathiques

MS : Matière Sèche

des épandages de boues vis-à-vis des sols, de la chaîne alimentaire et des autres compartiments de l'environnement.

Les boues de station d'épuration contiennent de grandes variétés de bactéries provenant des eaux usées et des processus de traitement parmi lesquelles certaines sont pathogènes (Dumontet *et al.* 2001; Romdhana *et al.* 2009). Ces bactéries pathogènes sont principalement d'origine entérique et peuvent aussi bien affecter les hommes que les animaux (Lepeuple *et al.* 2004). Leur présence dans les boues peut varier en fonction de la taille de l'agglomération, l'état sanitaire de la population raccordée, la nature des eaux recueillies par le réseau et des traitements effectués sur les eaux et les boues (Dumontet *et al.* 2001). L'arrêté du 8 janvier 1998 sur l'épandage des boues d'épuration définit l'hygiénisation comme un «traitement (physique ou chimique) qui réduit à un niveau non détectable les agents pathogènes présents dans la boue» (<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT0000000570287>). Une boue est considérée comme hygiénisée à la suite d'un traitement si elle présente des concentrations en salmonelles, entérovirus et 3 ufs d'helminthes inférieures aux normes définies (Tableau I-5) (Courtois 2000). Ces 3 microorganismes pathogènes de référence ont été choisis comme témoins pour leur fréquence dans les boues, leurs impacts sanitaires, l'existence de méthodes de détection et leur capacité de résistance aux traitements d'assainissement. La plupart des boues épandues en France ne sont pas hygiénisées et la maîtrise du risque sanitaire repose sur l'application de règles de bonnes pratiques : distances vis à vis des habitations et des points d'eau à respecter, délais avant les cultures maraîchères et avant la mise au pâturage des animaux à respecter et interdiction d'épandre lors de certaines conditions climatiques (Courtois 2000).

### III 6 3 6 L'irrigation

L'agriculture est aujourd'hui le secteur d'activité qui consomme le plus d'eau. Cette eau est principalement destinée à l'irrigation des cultures afin d'assurer une bonne production végétale (AFD 2011). Dans les régions du monde dont les ressources en eau douce sont limitées, telles que le Japon, le bassin méditerranéen (Israël, Tunisie, Chypre, Espagne), les Etats-Unis (surtout la Californie) et l'Asie, une solution alternative a été adoptée visant à



**Tableau I-6. Normes microbiologiques définissant la qualité sanitaire des eaux usées traitées** (Arrêté du 2 août 2010 relatif à l'utilisation d'eaux issues du traitement d'épuration des eaux résiduaires urbaines pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts).

Paramètres	Niveau de qualité sanitaire des eaux usées traitées			
	A	B	C	D
Entérocoques fécaux (abattement en log)	4	3	2	2
Phages ARN F-spécifiques (abattement en log)	4	3	2	2
Spores de bactéries anaérobies sulfitoréductrices (abattement en log)	4	3	2	2
<i>E. coli</i> (UFC/100 ml)	250	10 000	100 000	–

**Tableau I-7. Niveau de qualité sanitaire des eaux usées traitées exigé selon le type de culture à irriguer.**

Type d'usage	Niveau de qualité sanitaire des eaux usées traitées			
	A	B	C	D
Cultures maraîchères, fruitières et légumières non transformées par un traitement thermique industriel adapté	+			
Cultures maraîchères, fruitières, légumières transformées par un traitement thermique industriel adapté	+	+		
Pâturage	+	+	(1)	
Espaces verts et forêts ouverts au public (notamment golfs)	+	(2)		
Fleurs vendues coupées	+	+		
Autres cultures florales	+	+	+	(3)
Pépinières et arbustes	+	+	+	(3)
Fourrage frais	+	+	(1)	
Autres cultures céréalières et fourragères	+	+	+	(3)
Arboriculture fruitière	+	+	+	(3)
Forêt d'exploitation avec accès contrôlé du public	+	+	+	(3) + (3)

+ : autorisée, : interdite.

(1) Sous réserve du respect d'un délai après irrigation de dix jours en l'absence d'abattoir relié à la station d'épuration et de vingt et un jours dans le cas contraire.

(2) Irrigation en dehors des heures d'ouverture au public.

(3) Uniquement par irrigation localisée, telle que définie à l'article 2.

recycler les eaux usées traitées (REU) pour l'irrigation (Toze 1997). Cette pratique évite de trop puiser dans l'eau des rivières et des nappes phréatiques notamment à la période d'étiage.

Quelle que soit leur origine (domestique, industrielle, agricole ou pluviale), les eaux usées non traitées sont généralement contaminées par des microorganismes pathogènes dont la plupart sont des bactéries (Toze 1997). Les eaux usées peuvent contenir des bactéries pathogènes provenant initialement des matières fécales humaines et animales (Toze 1997). Dans une étude réalisée par Lee *et al.*, 2006, les concentrations de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *E. coli* et *E. faecalis* ont été quantifiées par PCR quantitative dans les influents et effluents d'une station d'épuration municipale (Lee *et al.* 2006). Dans les eaux usées, *Salmonella* spp. et *E. coli* O157:H7 sont présents à des concentrations similaires tandis que *L. monocytogenes* n'est pas détecté (Lee *et al.* 2006). Dans les eaux usées générées par une exploitation laitière, *E. coli* pathogène est détecté par PCR quantitative dans les échantillons collectés en juin, août et octobre à des concentrations allant jusqu'à  $10^4$  cellules par ml d'eau usées. *S. enterica* et *L. monocytogenes* ne sont détectées que dans les échantillons d'eau usées prélevés en juin à des concentrations maximales de  $8,3 \times 10^4$  et  $6,6 \times 10^3$  cellules par ml d'eau usées, respectivement (Dungan *et al.* 2012). La présence de *Salmonella* spp. et *E. coli* O157:H7 dans les eaux usées a également été notée dans d'autres études (Ibekwe *et al.* 2002; Samie *et al.* 2009). L'irrigation des cultures avec des eaux usées non traitées présente donc un risque potentiel d'introduire des bactéries pathogènes dans le sol.

Afin de prévenir les problèmes de contamination de l'environnement et de santé publique liés à la présence potentielle de pathogènes dans les eaux usées non traitées, des normes et des réglementations ont été adoptées concernant le recyclage des eaux usées pour l'irrigation (Blumenthal *et al.* 2000). En France, la première tentative de réglementation de la réutilisation d'eaux traitées à des fins d'arrosage et d'irrigation date de la fin des années 80. L'arrêté publié le 2 août 2010, fixe les prescriptions sanitaires et techniques applicables à l'utilisation d'eaux usées traitées à des fins d'irrigation de cultures ou d'espaces verts (<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000022753522&dateTexte=&categorieLien=id>). Les eaux usées doivent être traitées avant leur recyclage et doivent répondre à des normes microbiologiques (Tableau I-6). Quatre niveaux de qualité sanitaire des eaux usées traitées ont été définis en fonction du type de culture à irriguer (Tableau I-7). Malgré les procédés de traitement des eaux usées, les effluents de stations d'épuration peuvent encore contenir des bactéries du genre *Salmonella* (Samie *et al.* 2009) et *E. coli*

O157:H7 (Ibekwe *et al.* 2002; Dungeni *et al.* 2010). *Listeria* spp. a été retrouvée dans 84% des échantillons d'eaux traitées provenant de 6 stations d'épuration. *L. monocytogenes* est l'espèce majoritaire identifiée parmi tous les isolats de *Listeria* spp. (Paillard *et al.* 2005). De même, une autre étude a démontré que *L. monocytogenes* était la seule espèce de *Listeria* isolée dans les effluents de stations d'épuration municipales et industrielles au point de rejet des eaux usées traitées dans l'environnement (Czeszejko *et al.* 2003).

#### **IV ó Survie des bactéries pathogènes dans le sol**

---

Le risque sanitaire associé aux bactéries pathogènes dans le sol va dépendre de leur capacité à survivre en dehors de l'hôte humain ou animal. Une fois introduites dans le sol via l'eau d'irrigation ou les amendements organiques contaminés ou les fèces d'animaux porteurs, les bactéries pathogènes peuvent persister assez longtemps dans le sol pour contaminer les récoltes. La capacité des bactéries pathogènes à survivre dans le sol va dépendre de leur aptitude à s'adapter à cet environnement. Le sol peut alors constituer un réservoir intermédiaire qui pourrait également agir comme vecteur de contamination. La survie des bactéries pathogènes dans le sol est influencée par des facteurs liés au microorganisme (espèce, concentration), au sol (paramètres physico-chimiques, flore microbienne endogène..) et aux conditions environnementales (température, précipitation, ensoleillement..) (Reddy *et al.* 1981; Crane and Moore 1986). Dans ce chapitre, l'influence des paramètres physico-chimiques, du mode d'occupation du sol, de la microflore endogène ainsi que l'influence des conditions environnementales sur la survie des bactéries pathogènes dans le sol seront discutées.

Les facteurs physico-chimiques, microbiologiques et climatiques des sols ne sont pas indépendants et interagissent de manière complexe sur la survie. Les différentes recherches conduites sur la survie des pathogènes dans les sols amendés ou non étudient l'effet des paramètres du sol ou de l'environnement de manière séparée ou combinée.

## IV ó 1 ó Influence des paramètres physico-chimiques et du mode d'occupation du sol

### IV.1.1 ó La texture du sol

La texture du sol apparaît être un facteur fondamental dans la survie des pathogènes (Jamieson *et al.* 2002). L'ensemble des études tendent à démontrer que les sols sableux sont peu favorables à la survie des bactéries pathogènes tandis que les sols argileux prolongent leur survie. *E. coli* O157, *Salmonella* et *L. monocytogenes* survivent plus de 32 jours dans un sol de prairie argilo-limoneux mais déclinent en moins de 32 jours dans un sol arable-sableux (Nicholson *et al.* 2005). Cette observation est confirmée pour *L. monocytogenes* dont la survie décline dans un sol sableux au cours des 35 jours d'incubation tandis qu'elle reste relativement stable dans un sol argileux (Dowe *et al.* 1997). Le même comportement est observé pour *Salmonella* spp. qui survit significativement mieux dans un sol argileux que dans un sol sablo-limoneux, indépendamment de la température d'incubation ou du temps de prélèvement (Holley *et al.* 2006). Les auteurs attribuent la meilleure survie de *Salmonella* spp. à la teneur en matière organique et la capacité d'humidité plus élevée dans le sol argileux que dans le sol sablo-limoneux (Holley *et al.* 2006). *E. coli* et *Enterococcus* spp. présentent une évolution similaire et déclinent plus rapidement dans un sol sablo-limoneux que dans un sol limono-argileux (Lau and Ingham 2001). Cette tendance est confirmée par Tate *et al.* qui met en évidence un taux de survie d'*E. coli* supérieur dans un sol argileux que dans un sol sableux (Tate 1978). *E. coli* O157 présente également une survie réduite dans un sol sableux comparé au sol argileux ou limoneux (Fenlon *et al.* 2000). Une étude conduite sur 36 sols arables montre que dans les premiers jours d'incubation, le déclin d'*E. coli* O157:H7 est plus rapide dans les sols sableux mais aucune différence significative de survie n'est finalement observée à la fin de l'étude entre les sols sableux et limoneux (Franz *et al.* 2008). Cependant, au sein du groupe des sols de type limoneux, la durée de survie est positivement liée à la présence de particules argileuses et la survie d'*E. coli* O157:H7 apparaît prolongée dans les sols présentant une texture fine.

Une autre étude a analysé l'effet de 3 types de sol (limoneux, limono-sableux et sableux) sur la survie d'*E. coli* et d'*Enterococcus* spp (Cools *et al.* 2001). Comme noté précédemment, *Enterococcus* spp. persiste mieux dans le sol limoneux, présentant le plus fort pourcentage d'argile, et décline plus rapidement dans le sol sableux (Cools *et al.* 2001). En revanche, dans cette étude, *E. coli* présente une différence comparé aux travaux décrits

jusqu'alors. *E. coli* survit significativement mieux dans le sol sableux que dans le sol limoneux ou limono-sableux (Cools *et al.* 2001). Cette différence par rapport aux autres études peut être expliquée par la présence d'un pourcentage plus élevé en carbone organique dans le sol sableux (2,4%) que dans le sol limoneux (1,1%) et le sol limono-sableux (1,5%) qui favoriserait la survie de *E. coli* (Cools *et al.* 2001).

Cependant, le type de sol ne semble pas toujours être le principal facteur influençant la survie de bactéries pathogènes. Quelques études ne rapportent aucune différence significative de la survie de *Salmonella* spp. et de *E. coli* en fonction du type de sol (Natvig *et al.* 2002; Danyluk *et al.* 2008). Par ailleurs, la température d'incubation peut moduler l'effet du type de sol sur la survie bactérienne. Dans l'étude de Cools *et al.*, 2001, les différences de survie de *Enterococcus* observées à 25°C entre 3 types de sol (limoneux, limono-sableux et sableux) disparaissent à 5°C (Cools *et al.* 2001).

#### IV6162 ó Le pH

Peu d'études sont axées sur l'effet du pH sur la survie des bactéries pathogènes notamment dans un milieu tel que le sol. La survie bactérienne est optimale pour une gamme de pH neutre (6-7) et décroît pour des pH extrêmes, acides ou basiques (Reddy *et al.* 1981; Crane and Moore 1986). En effet, si *L. monocytogenes* est capable de survivre plus de 200 jours dans certains sols, sa survie ne dépasse pas 1 semaine dans un sol de forêt. Les auteurs attribuent cette survie limitée au faible pH du sol (pH de 5,2) (McLaughlin *et al.* 2011).

#### IV6163 ó Nutriments et matière organique

La quantité de nutriments disponibles est un paramètre qui peut influencer la persistance des bactéries pathogènes dans le sol (Crane and Moore 1986; Jamieson *et al.* 2002). Généralement, les sols sont considérés comme oligotrophes, pauvres en éléments nutritifs (Hattori *et al.* 1976). Dans le sol, les nutriments proviennent principalement de la matière organique en décomposition. L'apport de toute substance sur le sol, telle que les amendements organiques, peut constituer un apport supplémentaire d'éléments nutritifs pour les microorganismes du sol.

La persistance de *E. coli* et de *E. faecalis* est prolongée par l'apport croissant de matière organique dans le sol via des eaux usées brutes ou divers types de boues de station d'épuration (Mallmann and Litsky 1951). Cependant, selon la nature de l'amendement organique appliqué sur le sol, les quantités de matière organique et d'azote apportées sont très variables et peuvent moduler la survie des bactéries pathogènes. Par exemple, l'application de fumier ou de compost, caractérisés par un fort ratio C/N, résulte en une libération lente des sources de carbone et d'azote facilement disponibles. A l'inverse, l'application de lisier ou de fertilisants chimiques permet une libération rapide de carbone et d'azote consommables par les bactéries pathogènes. Ainsi, la population de *E. coli* O157:H7 décroît plus rapidement dans les sols amendés par du fumier de bovin que du lisier de porc (Franz *et al.* 2008). L'addition de 1,25 mg de glucose par gramme de sol prolonge la survie de *E. coli* en comparaison à l'addition de 0,125 mg de glucose par gramme de sol correspondant à des taux de mortalité de  $-0,12 \text{ jour}^{-1}$  et  $-0,24 \text{ jour}^{-1}$  respectivement (Habteselassie *et al.* 2008). En revanche, l'ajout d'une faible concentration en glucose dans le sol ( $0,125 \text{ mg.g}^{-1}$ ) résulte en un plus grand déclin comparé au sol témoin sans glucose ajouté. Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'apport d'une faible concentration en glucose entraîne une augmentation de l'activité de *E. coli*. Cependant, cette concentration n'est pas suffisante pour permettre la croissance de *E. coli* car le glucose est épuisé trop rapidement. Cette observation suggère que l'ajout de nutriments en dessous d'un certain niveau seuil peut être préjudiciable à la survie des bactéries pathogènes dans le sol (Habteselassie *et al.* 2008).

Quelques études prennent en compte l'influence de la concentration en cations, de la capacité d'échange cationique, et du ratio de saturation en cations basiques sur la survie des bactéries dans le sol (Kibbey *et al.* 1978; Zhai *et al.* 1995). Dans une étude, la croissance de *L. monocytogenes* et *Yersinia pseudotuberculosis* est favorisée dans le sol présentant les plus grandes concentrations en ions calcium et magnésium (Sidorenko *et al.* 2006). Dans une autre étude, la mortalité de bactéries fécales (coliformes totaux, coliformes fécaux) est plus élevée dans du sol prélevé à une profondeur de 15 à 30 cm par rapport à du sol prélevé en surface (Zhai *et al.* 1995). De faibles valeurs de pH, de ratio de saturation en cations basiques, de matière organique et d'azote total sont les facteurs environnementaux les plus évidents qui contribuent à cette différence de survie (Zhai *et al.* 1995).

#### IV6164 ó Mode d'occupation du sol

##### ▪ Couvert végétale

La présence de végétation dans un sol peut avoir un effet sur la survie des bactéries pathogènes. En effet, la présence de racines modifie localement les propriétés du sol par la production d'exsudats qui sont une source d'éléments nutritifs pour les bactéries (Bacilio-Jiménez *et al.* 2003; Bais *et al.* 2006). De plus, la rhizosphère est colonisée par des communautés bactériennes dont la structure et la composition peuvent varier en fonction de l'espèce végétale qui s'y développe (Marschner *et al.* 2001). La couverture végétale peut donc exercer un effet indirect sur la survie des bactéries pathogènes de par les communautés bactériennes présentes dans la rhizosphère (Brandl 2006). La présence de bactéries pathogènes opportunistes telles que *Burkholderia* spp. et *Stenotrophomonas* spp. dans la rhizosphère a déjà été constatée (Berg *et al.* 2005).

La survie d'*E. coli* O157:H7 et de *S. Typhimurium* dans un sol amendé supportant la culture de choux est prolongée comparé à leur survie dans un sol amendé sans culture (Ongeng *et al.* 2011a; Ongeng *et al.* 2011b). D'autres auteurs ont également mis en évidence une amélioration de la survie d'*E. coli* O157:H7 dans la rhizosphère de laitue en comparaison au même sol nu (Ibekwe *et al.* 2006; Semenov *et al.* 2009). Les résultats des différentes études indiquent cependant que l'effet de la rhizosphère sur la stimulation de la survie des bactéries pathogènes est spécifique des espèces végétales. En effet, la survie d'*E. coli* O157 varie de 25 à 40 jours dans un sol en présence de racines de trèfle et de vesce velue, comme observé dans le même sol en jachère (Gagliardi and Karns 2002a). En revanche, *E. coli* O157 persiste plus longtemps dans la rhizosphère de seigle (47696 jours) et de luzerne (92 jours) (Gagliardi and Karns 2002a). Le maïs est aussi une espèce végétale dont la rhizosphère n'affecte pas la survie d'*E. coli* O157:H7 dans l'étude de Williams *et al.* (Williams *et al.* 2007).

##### ▪ Les pratiques agricoles

Les pratiques agricoles peuvent exercer une forte influence sur la survie des pathogènes due aux modifications qu'elles entraînent sur la structure (par exemple, le labour) et sur la chimie du sol (ajout d'amendements, modification du pH du sol.). En conditions réelles, les bactéries pathogènes ne sont pas introduites seules dans le sol mais *via* une matrice

telle que les amendements organiques ou l'eau d'irrigation. Or, les amendements organiques, et dans une moindre mesure l'eau d'irrigation, possèdent des propriétés physico-chimiques propres, différentes de celles du sol, qui peuvent modifier la survie des bactéries pathogènes dans le sol.

La nature de l'amendement organique appliqué sur le sol peut avoir un effet sur la survie des bactéries pathogènes. En effet, selon l'espèce animale et son régime alimentaire, les fumiers et lisiers vont présenter des taux de matières organiques, d'azote et des pH diversifiés qui vont agir différemment sur la persistance des pathogènes dans le sol (Nicholson *et al.* 2005). Dans l'ensemble, le fumier et le lisier améliorent la survie des bactéries pathogènes lors de leur introduction dans le sol par l'apport de nutriments (Dazzo *et al.* 1973), d'azote (Gagliardi and Karns 2000) et de matière organique (Tate 1978). En effet, l'inoculation du sol par de l'eau stérile contaminée par *E. coli* aboutit à un déclin plus rapide que l'incorporation de cette souche dans le sol par du lisier ou des fèces (Oliver *et al.* 2006). Il en est de même pour *Salmonella* spp. dont la survie dans le sol est prolongée lorsqu'elle est introduite via du fumier de porc (Holley *et al.* 2006). La survie d'*E. coli* O157:H7 a été examinée dans 36 sols amendés sous une gestion conventionnelle ou biologique (Franz *et al.* 2008). Aucune différence de survie n'est observée entre ces 2 modes de gestion du sol. Ceci est attribué à la composition physico-chimique similaire entre des sols traités par gestion conventionnelle ou biologique. Cependant, cette étude indique que le carbone et l'azote organique dissous ainsi que la teneur en substrats carbonés facilement disponibles sont les paramètres prédictifs pour la survie d'*E. coli* O157:H7 dans ces sols. La survie d'*E. coli* O157:H7 est donc réduite dans les sols pauvres en nutriments. Il a donc été suggéré que favoriser un environnement oligotrophique dans le sol pourrait être un outil de gestion efficace pour réduire le risque de transmission d'*E. coli*. Ceci pourrait être réalisé en réduisant l'apport d'engrais minéraux qui constituent une source facilement accessible d'azote, et en augmentant l'apport d'amendements organiques complexes (tel que le fumier et le compost) avec un ratio C/N élevé (van Bruggen *et al.* 2006). *E. coli* décroît plus rapidement dans les sols amendés avec du fumier de bovin que les sols amendés avec du lisier de porcs (Unc and Goss 2006). La survie de *E. coli* O157:H7 est significativement plus longue dans le sol amendé avec du lisier ( $29,7 \pm 1,8$  jours) qu'avec du fumier ( $17,8 \pm 5,8$  jours), alors que la survie de *S. Typhimurium* n'est pas modifiée par la nature de l'amendement organique (Semenov *et al.* 2009). La tendance inverse est observée dans une autre étude rapportant une survie prolongée d'*E. coli* dans un sol amendé avec des fèces comparé au lisier. La teneur en



matières fécales est 4 fois inférieure dans le lisier et peut expliquer la capacité plus faible de cet amendement à assurer la survie de *E. coli* (Oliver *et al.* 2006). L'effet du type de fumier sur la survie de *E. coli* O157:H7 et *Salmonella* Typhimurium a également été démontré dans une étude en lysimètre (Nyberg *et al.* 2010). Ces 2 bactéries présentent une tendance de déclin semblable, survivant 15 et 90 jours dans les sols amendés avec de l'urine humaine et du fumier de volaille, respectivement. Dans les sols amendés avec du lisier de bovin, *E. coli* O157:H7 et *Salmonella* Typhimurium présentent une survie intermédiaire. Le temps de survie plus long des 2 pathogènes en présence du fumier de volaille est attribué à une teneur élevée en matière organique qui protège les pathogènes de l'environnement oligotrophique du sol et fournit une plus grande surface pour échapper à la prédation et à la compétition des microorganismes natifs du sol.

Le mode d'application des amendements organiques sur le sol affecte la durée de survie des bactéries pathogènes (Jamieson *et al.* 2002; Holley *et al.* 2006; Entry *et al.* 2010). En agriculture, les amendements peuvent soit être déposés à la surface du sol ou soit être incorporés dans les 10 premiers centimètres du sol. L'incorporation de l'amendement a pour but de réduire l'odeur nauséabonde, de limiter les émissions d'ammonium gazeux ainsi que le transport des pathogènes par ruissellement de surface (Hutchison *et al.* 2004b; Nicholson *et al.* 2005). Les résultats diffèrent entre les études selon leur design expérimental. En conditions extérieures, l'incorporation de fumier ou lisier contaminés dans le sol est plus favorable à la survie des bactéries pathogènes que l'épandage à la surface du sol. En effet, déposées à la surface du sol, les bactéries pathogènes contenues dans les amendements vont être exposées aux UV et à la dessiccation par l'air et vont décroître plus rapidement que lorsqu'elles sont incorporées dans le sol. Ainsi, le taux de survie de *Salmonella* spp., *Listeria* spp., et *E. coli* O157 est plus élevé lorsque l'amendement est directement mélangé au sol (Hutchison *et al.* 2004b). De même, la survie de *Salmonella* Typhimurium et *E. coli* O157:H7 est prolongée quand le fumier ou le lisier est injecté dans le sol plutôt qu'étalé à la surface du sol (Semenov *et al.* 2009). La survie de *E. coli* et *Salmonella* Typhimurium dans un sol amendé a été évaluée en fonction de 4 modes d'application du lisier sur le sol : application du lisier suivi par un labour + hersage, application du lisier suivi du hersage seul, application du lisier sur un sol recouvert de semis de blé datant de l'hiver précédant et finalement, injection du lisier dans un sol recouvert de semis de blé (Boes *et al.* 2005). Les résultats indiquent que le labour et le hersage du sol juste après l'application de lisier est une méthode efficace pour réduire la survie des bactéries pathogènes. Ni *E. coli* ni *Salmonella* ne sont détectables à la surface du

sol dès 2 heures après le labour et le hersage. Pour les autres méthodes d'application, le déclin des bactéries est similaire. *E. coli* n'est plus détecté après 21 jours et *Salmonella* ne survit pas plus de 7 jours (Boes *et al.* 2005). L'application de différentes quantités de fumier (par rapport à la norme agronomique : 37000 L.ha<sup>-1</sup>) a été testée sur la survie de *Salmonella* Anatum dans le sol mais aucune différence significative n'a été observée (Gessel *et al.* 2004).

## IV 6 2 6 Les paramètres biotiques du sol

### IV6261 6 Impact des microorganismes totaux

Lorsque des bactéries sont introduites dans un sol, elles sont en compétition à la fois pour l'utilisation des éléments nutritifs disponibles et pour la colonisation des divers micro-habitats avec la flore résidente du sol. L'importance des microorganismes indigènes du sol sur la survie des bactéries pathogènes a déjà été mise en évidence en comparant leur persistance dans un sol stérile et non stérile (Jiang *et al.* 2002; You *et al.* 2006; McLaughlin *et al.* 2011). Généralement, une amélioration significative de la survie, voire même une croissance des bactéries pathogènes est notée dans des sols et des fumiers stérilisés, dépourvus de tout microorganisme endogène. *S. Newport* persiste 332 jours dans un sol non stérile et 405 jours dans un sol stérile lorsqu'elle est introduite *via* un amendement contaminé (You *et al.* 2006). L'impact des microorganismes natifs du sol a également été mis en évidence pour *E. coli* O157:H7 dont la population décroît plus rapidement dans un sol amendé non-stérile quelle que soit la température d'incubation (5°C, 15°C et 21°C) (Jiang *et al.* 2002). La population de *L. monocytogenes* introduite dans différents types de sol non stériles décline au cours du temps tandis qu'elle se développe et/ou se maintient dans les mêmes sols stériles (Botzler *et al.* 1974; Dowe *et al.* 1997; McLaughlin *et al.* 2011).

### IV6262 6 Impact des communautés bactériennes

Ces approches en sols stériles ont apporté des informations importantes quant à l'effet des microorganismes indigènes totaux du sol sur la survie des bactéries pathogènes. Cependant, dans ces approches, l'effet des communautés bactériennes ne peut être dissocié des autres micro-organismes (champignons, protozoaires). La modification des communautés

bactériennes du sol, en termes de richesse et de diversité (par une méthode de dilution-extinction, fumigation) représente une approche plus réaliste des interactions inter-espèces opérant dans le sol. Dans une étude de ce type, les communautés bactériennes d'un sol ont été extraites par lavage et diluées en série ( $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$ ) avant d'être réintroduites dans des microcosmes contenant le même sol stérilisé (van Elsas *et al.* 2012). Après établissement des communautés indigènes, *E. coli* O157:H7 est inoculé dans les microcosmes de sols dont la diversité des communautés bactériennes décroît avec les dilutions. Le sol non stérile est utilisé comme témoin et contient la diversité de communautés bactériennes la plus élevée. Une corrélation négative apparaît entre la survie d'*E. coli* O157:H7 et la diversité des communautés bactériennes dans les microcosmes. En effet, la survie d' *E. coli* O157:H7 est accrue dans les microcosmes de sols contenant les communautés les plus diluées ( $10^{-6}$  et  $10^{-3}$ ) et diminue dans le sol non stérile et la dilution  $10^{-1}$  (van Elsas *et al.* 2012). La diversité microbienne du sol est donc un facteur clé qui contrôle la capacité des pathogènes à s'établir dans le sol. Ces résultats sont comparables à une précédente étude visant à inoculer *E. coli* O157:H7 dans des microcosmes de sols dont la composition des communautés bactériennes a été modifiée par différents temps de fumigation. La réduction de la diversité bactérienne, proportionnelle à l'augmentation du temps de fumigation, améliore la persistance d'*E. coli* O157:H7 dans le sol (van Elsas *et al.* 2007). L'altération de la composition des communautés bactériennes par fumigation et la survie d'*E. coli* O157:H7 ont également été suivies dans 2 sols présentant une texture contrastée (sableux et argileux). La richesse et la diversité des communautés sont initialement plus élevées dans le sol argileux que dans le sol sableux. Après fumigation, la diversité microbienne dans le sol sableux est plus affectée que dans le sol argileux favorisant une meilleure survie d'*E. coli* O157:H7 dans le sol sableux que dans le sol argileux (Ibekwe *et al.* 2010).

#### IV6263 ó Action des protozoaires

Les protozoaires sont des eucaryotes unicellulaires hétérotrophes qui sont capables de se déplacer dans leur habitat. Ils sont très répandus dans les milieux aquatiques et sont également retrouvés dans les sols. Ils se déplacent dans l'eau retenue dans les micropores et à la surface des microagrégats. Les protozoaires se nourrissent, entre autres, de bactéries qu'ils ingèrent par endocytose. Ils participent à la régulation des populations bactériennes dans les sols. Les protozoaires les plus petits sont plus performants dans la prédation car ils peuvent

facilement s'immiscer dans les pores du sol où se trouvent les colonies bactériennes. Le déclin du nombre d'UFC de *S. Typhimurium* est significativement corrélé au développement de la population de protozoaires dans le sol indiquant clairement un phénomène de prédation. Le déclin de *S. Typhimurium* est accentué dans le même sol amendé qui contient initialement un nombre plus important de protozoaires (Garcia *et al.* 2010). La survie de 3 bactéries pathogènes, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* et *Campylobacter jejuni* a été suivie en co-culture avec le protozoaire *Cercomonas* sp. Les protozoaires se développent en présence de *S. Typhimurium* et *C. jejuni* mais pas de *L. monocytogenes*. La survie de *S. Typhimurium* et *C. jejuni* est paradoxalement prolongée dans les co-cultures avec *Cercomonas* sp. tandis que la survie de *L. monocytogenes* reste inchangée (Bui *et al.* 2012). Cette étude suggère une relation de bénéfices mutuels où ce protozoaire se nourrit d'une partie des bactéries mais est capable de prolonger la survie de *S. Typhimurium* et *C. jejuni* en servant de structure protectrice et de véhicule de dissémination (Bui *et al.* 2012). En effet, certaines bactéries sont capables de survivre et de se multiplier dans les protozoaires bien qu'une spécificité entre l'espèce de protozoaire et le genre bactérien existe. En microscopie, de nombreuses cellules intègres de *S. Thompson* sont observées dans les vésicules d'endocytose du protozoaire *Tetrahymena*. *S. Thompson* est capable de résister à la lyse dans la vacuole et est éliminée dans le milieu extérieur par exocytose. En revanche, *L. monocytogenes* est rapidement digérée après la phagocytose (Brandl *et al.* 2005). D'autres études démontrent que différents sérovars de *Salmonella* spp., *E. coli* 0157:H7 et *L. monocytogenes* ont la capacité de se multiplier dans la vacuole des protozoaires du genre *Acanthamoeba* (Ly and Müller 1990; Tezcan-Merdol *et al.* 2004; Barker *et al.* 2006). Les protozoaires ont donc un rôle déterminant dans la protection des bactéries pathogènes et leur dispersion dans l'environnement.

#### IV ó 3 ó Les paramètres environnementaux

Les conditions climatiques comprenant l'hygrométrie, la température et l'ensoleillement sont des paramètres qui varient à chaque saison et influencent la survie des bactéries pathogènes.

##### IVó3ó1 ó La température

De manière générale, la température apparaît être un facteur important qui influence la survie des bactéries pathogènes dans le sol (Reddy *et al.* 1981). Bien que la température du sol soit généralement inférieure à la température optimale de croissance des bactéries

pathogènes, la survie de la population de pathogènes est prolongée lorsque la température avoisine 5°C. *S. Typhimurium* survit plus longtemps dans des microcosmes de sols incubés à 5°C qu'à 15°C et 25°C. L'amélioration de la survie à 5°C est observée à la fois lorsque *S. Typhimurium* est introduite directement dans le sol ou *via* du fumier frais inoculé (Garcia *et al.* 2010). De même, *S. Enteritidis* décroît rapidement à 35°C et atteint la limite de détection à 28 jours tandis qu'à une température de 20°C, la survie est maintenue plus de 140 jours (Danyluk *et al.* 2008). La diminution du taux de mortalité de *Enterococcus* spp. et de *E. faecalis* est également observée pour de faibles températures (Kibbey *et al.* 1978). Semblablement, la population de *L. monocytogenes* décline plus rapidement dans un sol incubé à 30°C que dans un sol incubé à 25°C et 8°C (McLaughlin *et al.* 2011).

Bien que *Salmonella* spp. survive mieux à basse température, une incubation à -18°C simulant les conditions hivernales provoque un déclin rapide de la population dans le sol (Holley *et al.* 2006). Les traitements de gel-dégel appliqués à un sol inoculé ont un effet négatif sur la survie des bactéries pathogènes (Weiser and Osterud 1945). Le cycle de gel-dégel aboutit à une réduction du nombre de *S. Typhimurium* et *E. coli* dans un sol amendé (Natvig *et al.* 2002).

Cependant, dans des conditions extérieures, lorsqu'un amendement contaminé est appliqué au sol, la température du sol n'est pas fixe et fluctue à court terme comme à long terme. Du fumier de bovin contenant initialement *E. coli* a été inoculé avec *S. enterica* et a été incorporé à 2 types de sol maintenus dans 2 chambres à environnement contrôlé. Les conditions dans les 2 chambres simulent les températures moyennes et quotidiennes pour une application réalisée en mars ou en juin. L'épandage de fumier inoculé au printemps, au mois de mars (températures moyennes < 10°C), est moins favorable à la survie de *S. enterica* et *E. coli* que l'épandage en été, au mois de juin (températures moyennes > 20°C). Cette observation diffère des expériences réalisées au laboratoire à température fixe qui rapportent une survie prolongée des bactéries pathogènes pour de basses températures d'incubation. La différence entre les 2 types d'expérimentation est justifiée par des fluctuations de températures plus fréquentes en Mars qu'en Juin qui provoqueraient le déclin plus rapide des pathogènes dans le sol (Natvig *et al.* 2002).

#### IV6362 ó Lhumidité

Un des principaux facteurs qui influencent la survie des bactéries pathogènes dans le sol est la disponibilité de l'eau (Reddy *et al.* 1981). La teneur en eau d'un sol varie énormément selon sa composition, la pluviométrie, l'écoulement de l'eau et la couverture végétale. L'humidité du sol joue un rôle clé dans la survie des bactéries pathogènes (Reddy *et al.* 1981). En général, les sols humides sont plus propices à la survie des bactéries pathogènes que les sols secs, comme démontré dans de nombreuses études. Ainsi, *L. monocytogenes* survit environ 70 jours dans des sols où l'humidité, non contrôlée, diminue au cours du temps contre plus de 200 jours dans les mêmes sols maintenus à humidité constante (Welshimer 1960). Les souches d'*E. coli* non pathogènes et *E. coli* O157:H7 présentent un taux de mortalité plus élevé dans le sol caractérisé par le potentiel matriciel le plus faible, correspondant à une disponibilité en eau moindre (Mubiru *et al.* 2000). D'ailleurs, l'effet négatif d'un faible potentiel matriciel sur la survie et la croissance des bactéries dans le sol a été documenté (Griffin 1981). La survie de *Salmonella* spp. dans le sol est favorisée pour les pourcentages d'humidité les plus élevés. Quel que soit le type de sol, pour une humidité de 60% de la capacité au champ, le temps de réduction décimal de *Salmonella* spp. varie de 7 à 17 jours dans un sol sablo-limoneux contre 29 à 32 jours pour un sol argileux. Le temps de réduction décimal est augmenté pour une humidité de 80% et fluctue de 13 à 36 jours dans le sol sablo-limoneux contre 31 à 79 jours pour un sol argileux (Holley *et al.* 2006). La population d'*E. faecalis* décline rapidement dans des sols humidifiés à 50% de la capacité au champ tandis qu'elle se maintient plus longtemps dans les mêmes sols dont l'humidité est proche de la saturation (Kibbey *et al.* 1978). De même, *E. coli* et *Enterococcus* spp. présentent en général une meilleure survie pour les taux d'humidité du sol les plus élevés (Cools *et al.* 2001). Cependant, dans cette étude, la différence de survie dans les sols humidifiés à 60%, 80% et 100% de la capacité au champ n'est pas significative pour *E. coli* à 15°C et pour *Enterococcus* spp. à 25°C

Dans certaines études, l'effet de l'humidité et de la température sur la survie des bactéries pathogènes dans le sol est étudié conjointement en conditions contrôlées ou naturelles. De manière générale, une faible température d'incubation combinée à une humidité élevée du sol favorisent la survie des bactéries telles que *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp., (Kibbey *et al.* 1978; Cools *et al.* 2001; Holley *et al.* 2006)

## **V ó Le sol : un vecteur de contamination des bactéries pathogènes**

---

Comme décrit précédemment, le sol est un réservoir pour les bactéries pathogènes car il peut assurer leur survie lorsque les conditions physico-chimiques rencontrées sont adéquates (humidité suffisante, pH proche de la neutralité, nutriments disponibles). Bien que les bactéries pathogènes puissent se fixer sur les particules de sol et y être retenues, elles peuvent être transférées sur les matières premières végétales mais également migrer dans le sol et contaminer les ressources en eau de surface et en eau souterraine. Le sol tient alors un rôle de vecteur de contamination indirecte de l'homme *via* le transfert possible des bactéries pathogènes directement aux fruits et légumes et aux ressources en eau.

### **V ó 1 ó Rôle du sol dans la contamination des végétaux**

Le transfert des bactéries pathogènes du sol aux végétaux a déjà été mis en évidence pour plusieurs espèces végétales. Le transfert peut survenir de manière directe par contact entre le sol contaminé et les graines ou de manière indirecte *via* les projections d'eau de pluie ou d'irrigation tombant sur le sol. Les végétaux peuvent ainsi constituer une niche écologique pour les bactéries pathogènes car elles sont capables de survivre à leur surface, de s'y multiplier voire de s'implanter dans leurs tissus (Brandl 2006; Deering *et al.* 2012). La consommation de végétaux peut donc présenter un danger pour le consommateur si les pathogènes se fixent sur la plante et y survivent jusqu'à la récolte et consommation du produit.

#### Vó1 ó Transfert des bactéries pathogènes d'un sol contaminé aux graines des végétaux

Le stade précoce de contamination des végétaux peut survenir au stade de la graine, lorsqu'elle entre en contact avec le sol. Le transfert de bactéries pathogènes d'un sol amendé contaminé aux graines a déjà été démontré (Vanrenterghem *et al.* 1991; Solomon *et al.* 2002). La catégorie des légumes racinaires, en contact direct avec le sol durant la majorité de leur croissance, est particulièrement exposée aux risques de contamination. La contamination des graines peut rapidement aboutir à la colonisation des tissus extérieurs des semis puis des

plantes (Kutter *et al.* 2006). Le comportement de *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* et *L. monocytogenes* a été suivi sur différentes graines de produits maraichers. L'inoculation de graines de carotte, cresson, laitue, moutarde, radis, épinard et tomates par immersion dans une suspension bactérienne aboutit à la multiplication significative de ces pathogènes à la surface des graines, pendant leur germination (Jablasone *et al.* 2005). Cependant, des différences de colonisation sont observées entre les espèces de bactéries pathogènes. *E. coli* O157:H7 et *L. monocytogenes* s'établissent et persistent sur les semis à des niveaux significativement supérieurs que *S. Typhimurium* (Jablasone *et al.* 2005). Une fois les graines semées dans un sol contaminé, *S. Typhimurium* peut persister jusqu'à 84 et 203 jours sur des radis et des carottes respectivement (Islam *et al.* 2004b). De même, *Escherichia coli* O157:H7 est détecté environ 70 jours sur des oignons et de la laitue et plus de 170 jours sur du persil et des carottes dont les graines ont été plantées dans un sol contaminé (Islam *et al.* 2004a; 2005). D'autre part, il s'avère que la période choisie pour amender un sol peut avoir un effet sur la capacité des pathogènes à contaminer les végétaux. Le transfert de *S. Typhimurium* et *E. coli* d'un sol amendé par du fumier contaminé aux graines de radis, de roquette et de carotte a été examiné durant la période de mars à août et de juin à septembre (Natvig *et al.* 2002). Durant la période de mars à août, peu de légumes apparaissent contaminés. *E. coli* est seulement détecté sur de la roquette après enrichissement, conjointement avec *S. Typhimurium*, ainsi que sur des radis. Les légumes sont plus fréquemment contaminés durant la période de juin à septembre. *E. coli* et *S. Typhimurium* sont détectés par isolement direct à partir de roquette et de radis (Natvig *et al.* 2002).

#### V6162 6 Contamination indirecte par éclaboussures

Actuellement, peu d'études décrivent le transfert des bactéries pathogènes du sol aux végétaux *via* la projection d'eau de pluie ou d'eau d'irrigation. Dans une expérience réalisée au champ, des plantules de persil ont été plantées dans un sol préalablement inoculé avec *Listeria innocua* puis une chute de pluie ou une irrigation par aspersion a été simulée. *L. innocua* est retrouvée sur les parties aériennes de persil et son nombre décroît lorsque le point d'impact entre le sol et l'eau s'éloigne de la plante (Girardin *et al.* 2005). Une étude plus approfondie a démontré que plus le volume des gouttes augmente, plus la quantité de *E. coli* transportée par projection est importante. Comme précédemment, une réduction du nombre de *E. coli* projeté est observée lorsque la distance du point d'impact des gouttes augmente.



Finalement, une goutte d'eau de 24-87 µl peut propulser *E. coli* présent dans le sol à une distance horizontale de 25 cm et une hauteur de 20 cm (Monaghan and Hutchison 2012). Les éclaboussures d'eau provoquées par l'arrosage ou la pluie constituent donc un mode de transfert non négligeable des bactéries pathogènes aux parties aériennes des plantes.

#### V6163 6 Internalisation des pathogènes par les végétaux

La présence de bactéries pathogènes à la surface des fruits et légumes destinés à être consommés crus représentent un risque potentiel pour la santé humaine. La majorité de ces bactéries peut être éliminée par un simple rinçage à l'eau. Cependant, un aspect plus problématique de la contamination des végétaux a été mis en évidence notamment grâce à l'utilisation d'outils microscopiques couplés à l'utilisation de souches bactériennes fluorescentes. La contamination des végétaux pré ou post-récolte peut aboutir à l'internalisation des pathogènes au sein des tissus des végétaux (Erickson 2012). Ce mécanisme permet la protection des bactéries pathogènes contre tous les traitements de lavage intervenant après la récolte. Bien que de nombreuses études aient été menées sur la capacité des bactéries pathogènes de pénétrer dans les tissus des plantes, les mécanismes d'internalisation ne sont pas parfaitement élucidés. Ces études emploient des approches expérimentales différentes, notamment dans le mode de culture des plantes, ce qui peut expliquer la grande variabilité des résultats d'une expérience à l'autre (Hirneisen *et al.* 2012).

L'internalisation des bactéries pathogènes dans les tissus des végétaux peut se faire par inoculation des fleurs, des tiges, des feuilles *via* les stomates (Guo *et al.* 2001; Kroupitski *et al.* 2009; Deering *et al.* 2012). Cependant, la contamination du sol par des pathogènes va principalement favoriser l'internalisation de ces bactéries par le système racinaire. Peu après la germination de graines préalablement inoculées, l'internalisation de *E. coli* O157:H7 est mise en évidence dans des tissus de plantules de laitue suggérant une migration du pathogène à l'intérieur de la plante (Solomon *et al.* 2002). De plus, l'épandage de fumier contaminé sur des plants de laitue arrivés à maturité aboutit à l'internalisation de *E. coli* O157:H7 par le système racinaire qui migre ensuite dans la plante jusqu'aux feuilles, parties comestibles (Solomon *et al.* 2002). L'internalisation de bactéries pathogènes par les racines a également été démontrée sur des plants de tomates cultivés en hydroponie dans une solution nutritive contenant *Salmonella* spp. La bactérie *Salmonella* spp. est détectée dans les tiges et les

feuilles des tomates confirmant l'hypothèse que ce pathogène peut être transporté par voie systémique dans les plants de tomates (Guo *et al.* 2002). L'internalisation des bactéries pathogènes dans les tissus des plantes est un mécanisme complexe qui varie en fonction du type de plante, de son mode de culture et de la souche bactérienne (Hirneisen *et al.* 2012). *E. coli* O157:H7 est retrouvée à l'intérieur des tissus de cresson, de laitue, de radis et d'épinard dont les graines avaient été inoculées tandis que *S. Typhimurium* n'est internalisée que dans les plantules de laitue et de radis (Jablasone *et al.* 2005). En revanche, *L. monocytogenes* est restreinte à la surface des plantes et n'est jamais retrouvée dans les tissus des jeunes pousses (Jablasone *et al.* 2005; Kutter *et al.* 2006). Pour définir si l'efficacité de colonisation dépend de la plante ou de la bactérie, 3 cultivars de laitue ont été inoculés avec 5 sérovars de *Salmonella enterica*. Le nombre de plantes colonisées est significativement affecté par le sérovar de *Salmonella* mais pas par le cultivar de la laitue. Cependant, le degré de colonisation endophyte (nombre de bactéries par gramme de feuille) dépend de l'interaction entre cultivar de la laitue et le sérovar de *Salmonella* (Klerks *et al.* 2007). De plus, l'internalisation dans les tissus apparaît liée à la concentration initiale de bactéries pathogènes appliquée dans le sol via l'amendement ainsi que le moment où l'amendement contaminé est apporté sur les cultures. La colonisation endophyte de *E. coli* O157:H7 et *S. Typhimurium* n'est observée que lorsque du fumier fortement contaminé est appliqué au sol au moment de la transplantation des plants de choux (Ongeng *et al.* 2011b).

## **V ó 2 ó Rôle du sol dans la contamination de l'environnement - Transport et diffusion des bactéries pathogènes dans le sol**

Dans certaines conditions, les bactéries pathogènes présentes dans le sol peuvent migrer et être disséminées dans le sol et l'environnement. Leur transport est principalement déterminé par les flux d'eau intervenant dans le sol. L'apport massif d'eau suite à l'irrigation des terres ou à des chutes de pluie favorise le transport des pathogènes soit latéralement par les écoulements de surface (ou sub-surface), soit verticalement au travers des horizons du sol (Mawdsley *et al.* 1995). Comme pour la survie bactérienne dans le sol, le transport des bactéries pathogènes va dépendre de nombreux facteurs (Abu-Ashour *et al.* 1994). Parmi ces facteurs, le type de sol ainsi que la teneur et le débit en eau sont généralement cités comme les plus importants.

### V6261 ó Lessivage et transport vertical dans le sol

Le transport vertical des bactéries pathogènes est à la fois lié aux quantités d'eau (débits et volumes) apportées à la surface du sol ainsi qu'aux caractéristiques physico-chimiques de celui-ci. La structure du sol, incluant sa porosité, sa densité et son réseau de macropores, est un facteur qui influence l'écoulement de l'eau au travers de son profil et donc le transport des bactéries pathogènes. En général, la concentration des bactéries pathogènes apportée par les amendements est plus élevée en surface et décroît avec la profondeur du sol (Gagliardi and Karns 2000; Semenov *et al.* 2009; Bech *et al.* 2010). Malgré les propriétés adsorbantes de l'argile et de la matière organique qui favorisent la rétention bactérienne sur les particules de sol, la migration des pathogènes est accrue dans les sols à texture fine contenant plus d'argile. La migration de *S. Typhimurium* dans un sol limoneux structuré (21-39% d'argile) est comparée à un sol sableux moins structuré (5% d'argile) (Bech *et al.* 2010). *S. Typhimurium* peut être transportée à une profondeur d'1 mètre dans le sol limoneux mais ne migre pas plus de 0,5 mètre dans le sol sableux. Elle migre plus rapidement au travers de la colonne de sol limoneux et est retrouvée en plus grande quantité dans l'eau de drainage provenant de cette colonne (Bech *et al.* 2010). De même, les coliformes fécaux migrent plus profondément dans un sol limoneux que dans un sol sableux (Unc and Goss 2003). L'effet du type de sol sur le transport d'*E. coli* a également été mis en évidence dans 4 sols écossais. La quantité totale d'*E. coli* lessivée est largement supérieure dans le sol contenant le plus d'argile que dans les 3 autres sols incluant un sol sableux (Brennan *et al.* 2010). La différence de migration est attribuée aux variations structurelles entre les types de sol. Bien que les sols sableux présentent une grande porosité qui favorise un drainage rapide de l'eau au travers du sol, ce sont les sols argilo-limoneux, caractérisés par une faible porosité, qui favorisent la migration des bactéries pathogènes dans le sol. Les sols argilo-limoneux semblent présenter un plus grand nombre de chemins préférentiels d'écoulement de l'eau que les sols sableux. Ces routes préférentielles sont constituées d'un réseau de macropores connectés qui permettent une migration en profondeur des pathogènes (Bech *et al.* 2010; Brennan *et al.* 2010). L'observation du lessivage inégal d'*E. coli* survenant dans les colonnes remplies du même type de sol soutient l'hypothèse selon laquelle il existe des variations structurelles au sein des colonnes incluant le nombre et la continuité des chemins préférentiels (Brennan *et al.* 2010). L'importance du réseau de macropores est aussi mis en évidence en comparant la migration d'une bactérie dans un sol limono-sableux dont la structure naturelle a été conservée et dans le même sol compacté, dont les connexions entre les macropores ont été

supprimées. Le lessivage d'*E. coli* est maximum dans le sol présentant la plus faible densité (0,75 gramme de sol par cm<sup>-3</sup>) et diminue lorsque la densité augmente (Artz *et al.* 2005). La vitesse d'écoulement de l'eau dans le sol affecte l'attachement et le transport des bactéries aux particules. *E. coli* est retenu par le sol en plus grande proportion lorsque la vitesse d'écoulement est lente que lorsqu'elle est plus élevée (Guber *et al.* 2005).

La nature de l'amendement organique (fumier ou lisier) et la manière dont il a été appliqué sur le sol modifient aussi le transport des bactéries pathogènes. L'apport de fumier modifie l'attachement d'*E. coli* sur les particules des sols pour des concentrations bactériennes supérieures à 100 UFC.ml<sup>-1</sup>. Les particules de fumier constituent des sites de fixation supplémentaires qui entrent en concurrence avec celles du sol. Ainsi, l'attachement d'*E. coli* aux particules de sol diminue quand la quantité de fumier ajoutée augmente (Guber *et al.* 2005). L'épandage de lisier contribue à une infiltration plus profonde des bactéries dans le sol en comparaison à l'application de fumier (Unc and Goss 2003; Semenov *et al.* 2009). Le temps et la fréquence des précipitations après l'épandage de fumier sur le sol influencent fortement le mouvement vertical et latéral des bactéries pathogènes dans le sol. Le risque de lessivage des bactéries pathogènes dans le sol est plus important lorsque le premier épisode pluvieux arrive peu de temps après l'épandage (Ogden *et al.* 2001; Saini *et al.* 2003). Plus l'intervalle entre l'application de fumier contaminé sur le sol et les premières pluies est grand, plus le risque de lessivage d'*E. coli* diminue (Saini *et al.* 2003).

#### V6262 ó Ruissellement et transport horizontal sur le sol

Le transport horizontal des bactéries pathogènes intervient principalement dans les sols imperméables ou déjà saturés en eau. L'apport d'eau supplémentaire dans de tels sols suite à des chutes de pluie répétées ou à l'irrigation du terrain provoque un ruissellement d'eau à la surface du sol qui peut entraîner les bactéries pathogènes jusqu'aux plans d'eau destinés à la consommation, aux loisirs ou à l'irrigation (Mawdsley *et al.* 1995; Tyrrel and Quinton 2003). Comme le lessivage vertical, le ruissellement de l'eau entraînant les bactéries pathogènes sur la surface du sol est également influencé par un certain nombre de facteurs tels que le type d'amendement appliqué, la topographie du terrain, les précipitations d'eau (Mawdsley *et al.* 1995). Plusieurs études ont déjà mis en évidence le rôle de l'eau de ruissellement provenant de champs pâturés ou traités avec des amendements organiques sur la détérioration de la

qualité de l'eau (Reddy *et al.* 1981; Baxter-Potter and Gilliland 1988; Jamieson *et al.* 2002). La qualité de l'eau de ruissellement provenant d'une zone pâturée ou non-pâturée a été comparée sur une période de 3 ans. Le nombre de coliformes fécaux est 5 à 10 fois supérieur dans l'eau provenant de la zone pâturée alors que le nombre de coliformes totaux diffère peu. Le nombre de coliformes fécaux dépasse fréquemment les normes de qualité recommandées (Doran and Linn 1979). Ces résultats sont soutenus par une étude similaire qui révèle également que plus d'un an après le départ des bovins, le nombre de coliformes fécaux dans l'eau de ruissellement provenant du pré est toujours supérieur aux normes (Jawson *et al.* 1982). La présence de bactéries pathogènes et d'indicateurs de contamination fécale a été notée dans l'eau de ruissellement provenant de parcelles amendées (Thurston-Enriquez *et al.* 2005; Jaffrezic *et al.* 2011). Les coliformes fécaux sont presque toujours présents dans l'eau provenant d'un sol non amendé suggérant une source de contamination non-agricole (Patni *et al.* 1985). Le ruissellement des eaux pluviales urbaines peut aussi mobiliser et transporter des bactéries pathogènes de sources non ponctuelles jusqu'à la surface des plans d'eau comme des rivières, des lacs, les plages et les calanques (Fernandez-Alvarez *et al.* 1991; Noble *et al.* 2006; Sercu *et al.* 2008).

Il est généralement admis que les concentrations de micro-organismes pathogènes et d'indicateurs de contamination fécale dans les ruisseaux et les rivières sont plus élevées pendant les périodes de grandes pluies qui induisent des ruissellements d'eau par rapport à celles observées simplement dans des conditions de débit de base par temps sec. Des études ont montré une corrélation significative entre les périodes de précipitation extrême et l'apparition de maladies d'origine hydrique attribuables à des agents pathogènes (Curriero *et al.* 2001).

#### V6263 ó Exemples d'épisodes de contamination par transport des bactéries pathogènes du sol aux ressources en eau

La contamination des réserves d'eau potable (aquifères, puits) *via* le transport des bactéries pathogènes à travers un sol amendé a déjà été observé. Généralement, la contamination microbiologique de l'eau est fortement liée à la présence d'exploitations agricoles qui épandent sur le sol des amendements organiques. La contamination des ressources en eau potable peut entraîner d'importantes épidémies en raison du grand nombre de la population desservie par ces systèmes de distribution. Dans la ville de Walkerton

(Ontario, Canada) en mai 2000, la contamination du réseau d'eau municipal avec *Escherichia coli* O157: H7 et *Campylobacter jejuni* a abouti à 2300 personnes nécessitant une attention médicale dont 7 d'entre elles sont décédées. L'enquête sur les causes de la contamination de l'eau a indiqué que l'origine la plus probable était l'infiltration et le transport des bactéries pathogènes d'un sol amendé par du fumier au puits municipal. En effet, du fumier avait été étalé le mois précédent sur un sol près du puits incriminé. Le typage des souches isolées chez les malades correspondait à celui des souches isolées des animaux et du fumier de la ferme voisine. De fortes précipitations survenues début mai ont favorisé le transport des bactéries jusqu'au puits (O'Connor 2002). Dans la même région au Canada, une étude indique que la proportion de puits contaminés par des bactéries fécales est significativement plus élevée à proximité des fermes où du fumier est étalé. Une proportion de 34% des puits localisés près des fermes présente des concentrations en coliformes supérieures à la norme acceptable. Le pourcentage de puits contaminés décroît lorsque la distance entre leur position et celle de la ferme avoisinante augmente (Goss *et al.* 1998). Dans une région du sud de l'Italie, la présence de pâtures et l'épandage de fumier a provoqué une contamination microbiologique de deux aquifères. Les pics de contamination observés correspondent aux événements pluvieux qui ont provoqué une infiltration des bactéries dans le sol jusqu'aux aquifères (Celico *et al.* 2004).

## VI ó Objectifs de la thèse

---

Comme présenté dans la partie bibliographique, les bactéries peuvent survivre suffisamment longtemps dans le sol pour contaminer les productions végétales et être transportées par ruissellement jusqu'aux parcelles avoisinantes et aux cours d'eau. De par ses propriétés physico-chimiques, chaque sol possède un potentiel propre à assurer la survie des bactéries pathogènes dans des proportions variables. Jusqu'à présent, les études réalisées sur l'effet des propriétés des sols sur la survie des bactéries pathogènes étaient conduites sur un nombre limité de sols. De plus, seule la texture des sols était prise en compte dans les études mais aucune donnée sur les propriétés chimiques n'étaient prises en compte.

Le point fort de ma thèse repose sur le fait que nous avons travaillé sur un grand nombre de sols dont les paramètres physico-chimiques étaient déjà caractérisés.

Dans ce travail de thèse nous avons évalué l'incidence et le comportement de bactéries pathogènes dans un ensemble de sols prélevés à l'échelle du territoire français en fonction des paramètres physico-chimiques, climatiques et du mode d'occupation de ces sols. Parmi les microorganismes d'intérêt sanitaire, la bactérie pathogène *L. monocytogenes* et la bactérie pathogène opportuniste *E. faecalis* ont été choisies. Deux stratégies ont été adoptées :

(i) La première approche a consisté à déterminer l'incidence de *L. monocytogenes* et *E. faecalis* dans les sols à l'échelle nationale.

Nous avons opté pour une méthode de détection moléculaire par PCR quantitative nous permettant de collecter des données qualitatives et quantitatives. Deux systèmes de détection TaqMan, l'un spécifique de *L. monocytogenes* et l'autre d'*E. faecalis*, ont été développés et validés. Ces systèmes de détection ont été appliqués à une grande collection d'ADN de sols (é 1200). Les ADN sur lesquels nous avons travaillé ont été extraits à partir de sols secs ayant été collectés sur tout le territoire français et conservés dans la pédothèque de l'unité InfoSol de l'INRA d'Orléans. Ces ADN ont été extraits et fournis par la plateforme GenoSol (INRA, Dijon). Nous avons également déterminé l'incidence de *L. monocytogenes* et *E. faecalis* dans des sols frais prélevés à l'échelle d'un département : la Bourgogne. La recherche de ces bactéries a été réalisée avec les systèmes de détection TaqMan ainsi que par méthode culturale classique.

(ii) La seconde approche a visé à estimer la capacité de survie de *L. monocytogenes* et *E. faecalis* dans une collection de sols

Nous avons travaillé sur 100 sols secs fournis par l'unité InfoSol de l'INRA d'Orléans. Ces sols ont été choisis aléatoirement parmi tous les sols dont nous avons analysé l'ADN avec les systèmes de détection TaqMan. Des microcosmes de sols ont été réalisés afin de suivre la survie des 2 bactéries pathogènes par méthodes culturales classiques. Nous avons initié l'étude de l'effet de la microflore du sol sur la survie de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis* en suivant la survie de ces 2 bactéries dans des microcosmes de sols stérilisés. Les résultats obtenus pour la survie de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis* dans les sols ont été corrélés aux paramètres physico-chimiques, climatiques et au mode d'occupation disponibles pour les 100 sols.

Ainsi, grâce aux 2 approches employées pour étudier l'incidence et la survie de *E. faecalis* dans les sols français les objectifs étaient :

- Déterminer des informations sur l'état de contamination des sols en France par *L. monocytogenes* et *E. faecalis*.
- Identifier les sols à risque qui favorisent la survie des 2 pathogènes
- De mettre en évidence et hiérarchiser les paramètres des sols déterminants la survie de ces 2 bactéries pathogènes

L'ensemble de ces données serviront globalement à évaluer le rôle du sol comme réservoir pour *L. monocytogenes* et *E. faecalis*. A plus long terme, en prenant en compte d'autres modèles bactériens, ces résultats pourront permettre l'établissement d'un modèle de microbiologie prévisionnelle afin de prévoir les risques de persistance de ces agents pathogènes dans les sols.



# **Partie II**

## ***Résultats***

**Etude de l'incidence et de la distribution de  
*L. monocytogenes* et d'*E. faecalis* dans les  
sols à l'échelle du territoire français**

## **Partie II : Résultats ó Etude de l'incidence et de la distribution de *L. monocytogenes* et *E. faecalis* dans les sols à l'échelle du territoire français**

La seconde partie de ma thèse présente les résultats obtenus sur l'incidence de *L. monocytogenes* et *E. faecalis* dans les sols à l'échelle du territoire français et de la Bourgogne.

Cette partie est divisée en 2 articles :

- **L'article 1** est consacré à *L. monocytogenes* dont les résultats ont fait l'objet d'une publication dans Journal of Microbiological Methods.
- **L'article 2** traite de *E. faecalis* et les résultats sont également présentés sous forme d'article qui sera prochainement soumis pour publication.

La stratégie d'étude de l'incidence et de la répartition de *L. monocytogenes* et *E. faecalis* dans les sols est basée sur la même démarche expérimentale :

- Deux systèmes de détections moléculaires basés sur la PCR en temps réel (TaqMan), l'un pour *L. monocytogenes* et l'autre pour *E. faecalis* ont été développés et validés sur des souches pures et sur des microcosmes inoculés avec les souches cibles.
- Les systèmes de détection ont été employés pour quantifier la présence de ces 2 bactéries dans les ADN extraits de 1315 sols provenant du RMQS (les ADN extraits des communautés microbiennes des sols ont été fournis par la plateforme GenoSol de l'UMR 1347).
- La détection moléculaire par PCR en temps réel a été comparée à la détection par des méthodes culturales classiques (avec ou sans enrichissement) sur un sous-ensemble de 53 sols prélevés en Bourgogne.

**Article 1 ó Nation-wide study of the occurrence of *Listeria monocytogenes* in French soils using culture-based and molecular detection methods.**

---

Aude LOCATELLI<sup>1</sup>, Géraldine DEPRET<sup>1</sup>, Claudy JOLIVET<sup>2</sup>, Sonia HENRY<sup>3,4</sup>, Samuel DEQUIEDT<sup>1,5</sup>, Pascal PIVETEAU<sup>1,6</sup>, Alain HARTMANN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR1347 Agroécologie, Dijon, France

<sup>2</sup> INRA, US-1106 InfoSol, F-45075, France

<sup>3</sup> Université de Lorraine, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC),  
UMR 7360, YUTZ, France

<sup>4</sup> CNRS, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), UMR 7360, YUTZ,  
France

<sup>5</sup> INRA, Plateforme GenoSol, UMR1347 Agroécologie, Dijon, France

<sup>6</sup> Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, Dijon, France

Running title: Occurrence of *Listeria monocytogenes* in French soils



# Nation-wide study of the occurrence of *Listeria monocytogenes* in French soils using culture-based and molecular detection methods

Aude Locatelli<sup>a</sup>, Géraldine Depret<sup>a</sup>, Claudy Jolivet<sup>b</sup>, Sonia Henry<sup>c,d</sup>, Samuel Dequiedt<sup>a,e</sup>, Pascal Piveteau<sup>a,f</sup>, Alain Hartmann<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR1347 Agroécologie, Dijon, France

<sup>b</sup> INRA, US-1106 InfoSol, F-45075, France

<sup>c</sup> Université de Lorraine, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), UMR 7360, Yutz, France

<sup>d</sup> CNRS, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), UMR 7360, Yutz, France

<sup>e</sup> INRA, Plateforme GenoSol, UMR1347 Agroécologie, Dijon, France

<sup>f</sup> Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, Dijon, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 21 December 2012

Received in revised form 14 March 2013

Accepted 14 March 2013

Available online 6 April 2013

### Keywords:

*Listeria monocytogenes*

Real-time PCR

TaqMan type probe

Molecular detection

Culture-based detection

French soil monitoring network

## ABSTRACT

Soil is a potential reservoir of human pathogens and a possible source of contamination of animals, crops and water. In order to study the distribution of *Listeria monocytogenes* in French soils, a real-time PCR TaqMan assay targeting the phosphoribosylpyrophosphate synthetase (*prs*) gene of *L. monocytogenes* was developed for the specific detection and quantification of this bacterium within a collection of 1315 soil DNAs originated from the French Soil Quality Monitoring Network. The *prs* real-time PCR TaqMan assay was specific for *L. monocytogenes* and could quantify accurately down to 10<sup>4</sup> *L. monocytogenes* per gram of dry soil. Among the 1315 soil DNAs, *prs* was not detected. This suggested that the level of *L. monocytogenes* in French soils is generally less than 10<sup>4</sup> *L. monocytogenes* per gram of dry soil. In order to confirm this hypothesis, we investigated the occurrence of *L. monocytogenes* in samples collected in the Burgundy region by culture-based and molecular detection methods on the same samples. By using cultivation-based detection, 17% of samples were positive for the presence of *L. monocytogenes* while only 2% were found positive by the molecular detection method. *L. monocytogenes* was repeatedly isolated from cow pasture soils but not from cultivated soils, meadows or forest soils. Isolates were grouped in the serovar 1/2a or 3a and 4b or 4d or 4e. Taken as a whole, molecular detection results globally demonstrate that the level of *L. monocytogenes* in French soils does not exceed 10<sup>4</sup> CFU per gram of dry soil. However, in comparison with culture-based method, PCR-based detection underestimates the occurrence of *L. monocytogenes* in soils. Soil sampling procedure also appears critical and may also lead to the underestimation of the incidence of *L. monocytogenes*.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Listeria monocytogenes* is a foodborne pathogen responsible for listeriosis a potentially fatal disease that results in meningitis, septicemia or abortion. This disease can affect man and a large range of wild and domestic animal species (Wesley, 1999). Outbreaks of human listeriosis have been reported worldwide and are mainly associated with consumption of contaminated food. *L. monocytogenes* can contaminate various foods such as meat, dairy products, vegetables and fish (Beuchat, 1996; Jacquet et al., 1995; Mead et al., 2006; Rocourt et al., 2000). Ready-to-eat food products, which are consumed without further cooking, are most likely at the origin of listeriosis outbreaks. Although listeriosis infections are uncommon, mortality rate reaches 30% in

at-risk people. As a consequence, *L. monocytogenes* is recognized as one of the most important foodborne pathogen.

*L. monocytogenes* is widely distributed in nature but its primary reservoir is not well defined (Fenlon, 1999). It is found on vegetation (Weis and Seeliger, 1975; Welshimer, 1968), water (Lyautey et al., 2007), sediment (Colburn et al., 1990; El Marrakchi et al., 2005) and soil (Weis and Seeliger, 1975; Welshimer, 1975). *L. monocytogenes* has been isolated from livestock, domestic and wild animals in both infections and latent states (Gray and Killinger, 1966), in animal feces and in the close environment of animals. Nightingale et al. (2004) showed that farm environment is a reservoir for *L. monocytogenes* (Nightingale et al., 2004). Cyclic transmission of *L. monocytogenes* between feed, animals and soil was evidenced by these authors. Assuming that transmission is most likely to proceed from highly contaminated compartments to less-contaminated compartments, on bovine farms, animals are most likely to be the source of environmental contamination. In addition, it has been reported that organic fertilization (Dowe et al., 1997) and irrigation with waste water may be a source of soil contamination. When

\* Corresponding author at: INRA Dijon, UMR1347 Agroécologie, 17 rue Sully BP86510, 21065 Dijon Cédex, France. Tel.: +33 3 80 69 32 95; fax: +33 3 80 69 32 24.

E-mail address: [alain.hartmann@dijon.inra.fr](mailto:alain.hartmann@dijon.inra.fr) (A. Hartmann).



conditions are favorable, *L. monocytogenes* can settle successfully in soil in spite of the presence of background microflora (Dowe et al., 1997). This may result in the contamination of vegetables and feedstuffs harvested from contaminated fields (Al-Ghazali and Al-Azawi, 1990; Nightingale et al., 2004). Girardin et al. (2005) had demonstrated that the transfer of the pathogen surrogate *Listeria innocua* from soil to parsley leaves can occur by splashing due to rain and irrigation. These authors showed that as few as 1 CFU g<sup>-1</sup> *Listeria* in soil led to contamination of parsley leaves (Girardin et al., 2005). Finally, direct transfer of *L. monocytogenes* from amended soil to seeds of carrots, lettuce, radish, spinach and tomato had been described (Jablasone et al., 2005).

Cultivation-based methods for *L. monocytogenes* detection and identification require a combination of enrichment procedures and selective plating. Numerous enrichment broths and plating media formulation have been used during the past 50 years for the selective cultivation of *L. monocytogenes* from foodstuff (Donnelly, 1999). The most commonly used culture reference methods world-wide for the detection of *L. monocytogenes* in foods are the ISO 11290 standards with Fraser broth (ISO, 1996). In the United States of America (USA) two main standards are used as reference methods to isolate *L. monocytogenes* from foods (Janzen et al., 2006). One of the protocols was developed by the US Food and Drug Administration (FDA) to isolate *Listeria* sp. from dairy products, seafood, and vegetables using the *Listeria* Enrichment Broth (LEB) (Hitchins, 2003). The US Department of Agriculture (USDA) developed another method to isolate the organism from meat and poultry products as well as from environmental samples (USDA, 2002a). Although these procedures are sensitive for the detection of *L. monocytogenes*, they are labor intensive and 2 to 4 days work are required for final identification. Still, detection and isolation of *L. monocytogenes* from environmental samples remains difficult. Cold enrichment at 4 °C has been used previously but it needs an incubation time of many weeks or months (Al-Ghazali and Al-Azawi, 1990; Gray and Killinger, 1966). DNA-based methods such as real-time PCR were developed for rapid, sensitive and specific quantitative detection of *L. monocytogenes*. These alternative methods rely on the detection of the virulence genes *hly* (Nogva et al., 2000), *iap* (Hein et al., 2002) or *prf* (Rossmann et al., 2006). Nevertheless, these detection systems have been validated and used for the detection and quantification of *L. monocytogenes* in pure culture, food and water but never in soil (Berrada et al., 2006; Nogva et al., 2000).

The goal of this study was to investigate the occurrence of *L. monocytogenes* in French soils using both culture-based and molecular detection methods. Molecular detection was conducted on a set of 1315 soil samples from the RMQS network (systematic nation-wide French soil monitoring network, GIS Sol, France: [www.gissol.fr/programme/rmq/rmq.php](http://www.gissol.fr/programme/rmq/rmq.php)). For this purpose, a new real-time quantitative PCR-based method using a TaqMan assay was developed for specific detection of *L. monocytogenes* from soil samples. A smaller set of fresh soil samples representative of various land use, chemistry and pedology of French soils was also analyzed using both culture-based and molecular methods in order to compare these methods.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial strains and culture conditions

A total of 46 bacterial strains supplied by the DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany), were used in this study (Table 1). *L. monocytogenes* DSMZ 19094, DSMZ 15675 and the type strain DSMZ 20600<sup>T</sup> were used as target organisms to validate the specificity and detection limits of the TaqMan assay in soil. Five strains of *Listeria* spp., 9 strains of *Enterococcus* spp., 10 strains of *Escherichia* spp., 5 strains of *Staphylococcus* spp. and 19 strains of *Salmonella* spp. were used as negative controls. Dried cultures of pure strains were rehydrated and cultivated in appropriate media according to the DSMZ catalog.

### 2.2. Soil samples

One thousand three hundred and fifteen soils were selected among the soil library of the French soil quality monitoring network (RMQS, Réseau de Mesure de la Qualité des Sols) (Jolivet et al., 2006). This network is based on the sampling of soil with a 16 × 16 km systematic grid covering the whole French territory. For each RMQS site, 25 core samples were collected from the top-soil (0–30 cm), using a stratified random sampling design within a 20 m × 20 m area. Core samples were bulked to obtain a composite sample for each site. Soil samples were air-dried and sieved to 2 mm before analysis. Their attributes such as location, pedology, chemistry and land use are stored in the DONESOL database (Grolleau et al., 2004). These dried soils were used for DNA extraction and detection of *L. monocytogenes* by real-time PCR (Table 2).

A subset of 53 fresh soils collected in Burgundy (from 20 RMQS sites and from 3 cow pastures) was used for the comparison of cultivation-based and PCR-based methods for the detection of *Listeria* sp. and *L. monocytogenes*. Twenty-three sites were targeted: 3 cow pastures, 8 cultivated fields, 11 meadows and 1 forest. Twenty of these 53 fresh soils were re-sampled from the RMQS network, with the same sampling strategy as described above. Soils were sampled between March and May 2011 from the top-soil (0–30 cm). The location and prevalence of *L. monocytogenes* within each of the 3 cow pastures was investigated further: 7, 10 and 16 soil samples were processed inside pasture C, pasture R and pasture M, respectively. These supplementary soil samples were collected randomly in the middle and the border of each pasture; moreover, particular areas were sampled as watering and feeding places. The 53 soil samples collected were sieved to 2 mm before analysis and were processed within 15 days. For fresh soils samples, relative humidity was measured after drying at 105 °C for 24 h. All results were expressed as per gram of dry soil.

### 2.3. DNA extraction and purification

Genomic DNA of bacterial strains was extracted from pure cultures with the DNeasy blood and tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. DNA of the 1315 dried soils of the RMQS library was extracted and supplied by the GenoSol platform ([http://www2.dijon.inra.fr/plateforme\\_genosol](http://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol)) as described previously (Dequiedt et al., 2011; Ranjard et al., 2003).

This procedure was then optimized for the extraction of DNA from spiked microcosms and fresh soils. Briefly, 8 ml of extraction buffer (100 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl and 2% (w/v) SDS), 4 g of silica beads (100 µm diameter), 5 g of ceramic beads (1.4 mm diameter) and 8 glass beads (4 mm diameter) were added to 2 g of soil in a 15 ml sterile tube. Samples were disrupted for 3 × 30 s at 4 m/s in a FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals Europe, Illkirch, France), incubated for 30 min at 70 °C and centrifuged for 5 min at 7000 ×g at room temperature. Supernatants were incubated on ice for 10 min with 1/10 volume of 3 M potassium acetate (pH 5.5) and then centrifuged for 5 min at 14,000 ×g. One volume of ice-cold isopropanol was added to the supernatant for DNA precipitation (overnight at –20 °C). DNA was collected by centrifugation (30 min at 14,000 ×g), and DNA pellets were washed with ice-cold ethanol (70%) and dissolved in 200 µl of water. Aliquots of crude DNA extracts (100 µl) were loaded on microbiospin columns (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) filled with 100 mg of polyvinyl polypyrrolidone (PVPP, Sigma Chemical Co, France). After centrifugation (4 min, 1,000 ×g, 4 °C), colorless eluted DNA was further purified using the Geneclean Turbo Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions.

Crude and purified DNA were loaded on a 1% agarose gel with a standard curve of calf thymus DNA ranging from 62.5 to 1000 ng per well (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). After coloration in ethidium bromide, the gel was photographed (Infinitycapt, Marne la Vallée, France) and intensity was estimated by Bio1D++ software



**Table 1**

Bacterial strains and corresponding C<sub>T</sub> value obtained in real-time PCR to validate the specificity and detection limits of the *prs* real-time PCR TaqMan assay.

Organisms	DSMZ strain number <sup>a</sup>	Source ( <i>Listeria</i> serotype) <sup>b</sup>	Average Ct value <sup>c</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	15675	Soft cheese (4b)	19.9
<i>Listeria monocytogenes</i>	19094	Poultry (1/2b)	19.8
<i>Listeria monocytogenes</i>	20600 <sup>T</sup>	Rabbit (1/2a)	20.9
<i>Listeria grayi</i>	20601 <sup>T</sup>	Feces of chinchilla	39
<i>Listeria innocua</i>	20649 <sup>T</sup>	Brain cow (6a)	Und
<i>Listeria welshimeri</i>	20650 <sup>T</sup>	Plant decaying material (1/2b)	Und
<i>Listeria ivanovii</i>	20750 <sup>T</sup>	Sheep (5)	Und
<i>Listeria seeligeri</i>	20751 <sup>T</sup>	Soil (1/2b)	36.3
<i>Enterococcus faecalis</i>	12956	Peritoneal fluid	38.7
<i>Enterococcus faecalis</i>	13591	Human eye	Und
<i>Enterococcus faecalis</i>	20371	Pleural fluid	Und
<i>Enterococcus faecalis</i>	20380	Abscess	Und
<i>Enterococcus faecalis</i>	20376	Raw milk	37.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	20409	Unk	Und
<i>Enterococcus faecalis</i>	20478 <sup>T</sup>	Unk	Und
<i>Enterococcus faecium</i>	20477 <sup>T</sup>	Unk	Und
<i>Enterococcus hirae</i>	20160 <sup>T</sup>	Unk	Und
<i>Escherichia raffinosus</i>	5633 <sup>T</sup>	Blood culture	Und
<i>Escherichia durans</i>	20633 <sup>T</sup>	Dried milk	Und
<i>Escherichia avium</i>	20679 <sup>T</sup>	Human feces	Und
<i>Escherichia mundtii</i>	4838 <sup>T</sup>	Soil	Und
<i>Escherichia gallinarum</i>	20628	Chicken intestine	Und
<i>Escherichia coli</i>	30083 <sup>T</sup>	Urine	Und
<i>Escherichia coli</i>	14166	Anaerobic digester fed	Und
<i>Escherichia coli</i>	3901	Unk	Und
<i>Escherichia coli</i>	5802	Food	Und
<i>Escherichia coli</i>	499	Unk	Und
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	20044 <sup>T</sup>	Nose	37.6
<i>Staphylococcus aureus</i>	20231 <sup>T</sup>	Human pleural fluid	Und
<i>Staphylococcus aureus</i>	2569	Wound	Und
<i>Staphylococcus aureus</i>	6732	Bovine udder	Und
<i>Staphylococcus capitis</i>	20326 <sup>T</sup>	Human skin	Und
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sv. <i>Thyphimurium</i> LT2	10506	Unk	Und
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sv. <i>Thyphimurium</i>	19587	Heart and liver tissues from 4-week-old chicken	Und
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sv. <i>Thyphimurium</i>	11320	Unk	Und
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sv. <i>Thyphimurium</i>	50912	Unk	Und
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sv. <i>Thyphimurium</i>	554	Unk	Und
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sv. <i>Thyphimurium</i>	5569	Unk	Und
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sv. <i>Enteritidis</i>	14221	Human stool	39.8
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sv. <i>Enteritidis</i>	17420	Unk	Und
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sv. <i>Enteritidis</i>	9898	Unk	Und
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sv. <i>Choleraesuis</i>	14846	Unk	Und
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sv. <i>Gallinarum</i>	4883	Unk	Und
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sv. <i>Gallinarum</i>	13674	Unk	Und
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sv. <i>Abony</i>	4224	Unk	Und
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sv. <i>Heidelberg</i>	9379	Unk	Und
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>salamae</i>	9220 <sup>T</sup>	Unk	Und
<i>Salmonella enterica</i> <i>arizonae</i>	9386 <sup>T</sup>	Unk	Und
<i>Salmonella bongori</i>	13772 <sup>T</sup>	Unk	Und
<i>Salmonella subterranea</i>	16208 <sup>T</sup>	Uranium contaminated subsurface sediment	Und

<sup>a</sup> All of the bacterial strains were obtained from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany. <sup>T</sup>: Type strain.

<sup>b</sup> Unk: Source of isolation is unknown.

<sup>c</sup> Average C<sub>T</sub> values were calculated from three reactions with *prs* TaqMan assay on DNA from pure bacterial strains using 10<sup>6</sup> genome equivalent. Und: no detectable real time PCR signal after 40 cycles.

(Fisher Scientific, Vilbert Lourmat, France). All purified DNA were diluted to 1 ng.μl<sup>-1</sup> in sterile water before quantification by real-time PCR.

#### 2.4. Real-time PCR assay for the detection of *L. monocytogenes* and target quantification

Primers and probe design: A real time PCR detection system assay targeting *prs*, a single copy gene coding for the phosphoribosylpyrophosphate synthetase was developed for this study. The Primer Express software (Applied Biosystems) was used to design the optimal set of probe and primers. The specificity of the assay for *L. monocytogenes* was verified *in silico* by BLAST analysis (<http://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>). A 68-bp product was amplified using primers PRSF (5'-GGT CCG GCT ATG AAA CGT ATT G-3'), PRSR (5'-CTG GAA GAG CGA TGG AGT TTG-3') and probe PRSS (5'-6FAM-TCG

CCA ATC GAA AAA TTA GTT GTT-TAMRA-3'). Primers and probe were synthesized by Eurogentec (Angers, France).

Quantitative real-time PCR was performed in MicroAmp Optical 96-well reaction plates and microAmp Optical Caps (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France). Amplification reaction mixtures (25 μl) contained 5 ng of template DNA, 1 × ABsolute QPCR ROX Mix (ABgene, Courtaboeuf, France), 20 ng/μl of T4 bacteriophage gene 32 product (MP Biomedicals Europe, Illkirch, France), 400 nM of PRSF and PRSR, 200 nM of PRSS. Negative controls were prepared by adding sterile water instead of template DNA. Real-time PCR cycles were: initial incubation at 95 °C for 15 min, 45 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Amplification and data acquisition were performed in an ABI Prism 7900HT Detection System (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France). Threshold cycle (Ct) data were obtained with the Sequence Detection System software (version 2.3).



**Table 2**

Land use of the 1315 soil samples used for DNA extraction and *L. monocytogenes* detection with *prs* real-time PCR TaqMan assay. These soils belong to the French RMQS soil library.

Land use	Number of soil samples
Waste land	9
Particular land use	26
Cultivated soil	397
Cultivated soil with alternance of temporary grasslands	125
Fallow land	32
Other-culture	10
Deciduous forest	194
Conifer forest	56
Mixed forest	98
Other-forest	8
Permanent grassland (> 10 year)	247
Grassland	36
Sowed grassland (6–10 year)	37
Unproductive grassland	13
Vineyards and orchards	26
Garden	1

A standard curve was generated to quantify *L. monocytogenes* in soil DNA samples. Genomic DNA of *L. monocytogenes* 20600<sup>T</sup> was used as template to amplify the target *prs* sequence with primers PRSR and PRSF. PCR products were cloned into TOPO® cloning vector and then introduced in competent *Escherichia coli* TOP10 (Life Technologies, France) by chemical transformation using the TOPO TA Cloning® kit (Life Technologies, France). Plasmids were extracted with the plasmid Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) linearized and quantified spectrophotometrically. Serial dilutions were performed in order to get from 10<sup>6</sup> to 10<sup>0</sup> *prs* copies per PCR reaction. Standard curves were generated by plotting the logarithm (log) of *prs* copy numbers introduced in PCR reaction and the corresponding Ct values. The number of *prs* copies per PCR reaction was calculated by comparison of the Ct values to the standard curve. The number of *prs* copies was then calculated per ng of extracted DNA and finally per gram of dry soil.

#### 2.5. Specificity of the real-time PCR assay targeting the *prs* gene

The specificity of the *prs* TaqMan assay was assessed on 46 genomic DNA extracted from pure bacterial strains. Real-time PCR assay was performed in triplicate, as described above, on each genomic DNA at final concentration of 10<sup>6</sup> genome equivalents.

#### 2.6. Detection of *L. monocytogenes* in soil microcosms spiked with known amounts of bacteria

To determine the detection limit and the accuracy of the *prs* real-time PCR assay (TaqMan), two soils (soils 332 and 1286) were spiked with known amounts of *L. monocytogenes* (strain 20600) and assays were performed with DNAs extracted from each inoculated soil microcosms. Microcosms were prepared from two grams of dry soil moistened to 80% of field capacity. Microcosms were then inoculated with 120 µl of a suspension of *L. monocytogenes* 20600<sup>T</sup> adjusted to inoculate from 10<sup>1</sup> to 10<sup>6</sup> bacteria per gram of dry soil. Non inoculated soil microcosms were used as controls and prepared simultaneously by adding 120 µl of sterile water. Total DNA was extracted from each microcosm 1 h after inoculation as described in Section 2.3. Three independent DNA extractions were performed on each microcosm and 3 PCR reactions were performed on each extracted DNA (n = 9).

#### 2.7. PCR inhibition

As humic acids are abundant in soils, they may be co-extracted with DNA even after purification and may act as inhibitors of the Taq polymerase thus reducing the efficiency and accuracy of the assay. The degree of inhibition of the 1315 DNA used in this study

was evaluated before *prs* gene quantification. The circularized pGEM®-T Easy plasmid (Promega, Charbonnières-lès-Bains, France) was used as an internal standard to test the efficiency of the PCR reaction in the presence of soil DNA. In a final volume of 25 µl, 10<sup>6</sup> copies of pGEM®-T Easy Vector was added to 5 ng of soil DNA, 1 × Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix, 20 ng/µl of T4 bacteriophage gene 32 product (MP Biomedicals Europe, Illkirch, France), 500 nM of primers SP6 (5'-ATTAGGTGACACTATAG-3') and T7 (5'-TAATACGACTCACTATAG-3'). Primers SP6 and T7, targeting RNA polymerase promoter sites on the pGEM®-T, allow to amplify a 200 bp-fragment of this plasmid. The ratio between the apparent copy numbers obtained by PCR amplification of 10<sup>6</sup> copies of the pGEM®-T plasmid in the presence or in the absence of soil DNA was calculated to assess the degree of PCR inhibition (%) by contaminants present in the soil DNA extracts.

#### 2.8. Culture-based detection and isolation of *Listeria* sp. and *L. monocytogenes* from soil samples

Three different selective enrichment protocols were implemented in order to optimize the detection of *Listeria* sp. and *L. monocytogenes* in fresh soils.

- LEB protocol: This enrichment protocol was carried out according to the FDA approved method (Hitchins, 2003). Ten grams of fresh soil was added to 90 ml of *Listeria* Enrichment Broth (LEB, Difco, France). This primary enrichment was incubated at 37 °C for 48 h, 100 µl of primary enrichment was then transferred in 10 ml of modified *Listeria* enrichment broth (UVM, Difco, France). Secondary enrichment was incubated at 37 °C during 24 h. One hundred µl of UVM secondary enrichment was spread on Polymyxin-Acriflavin-Lithium-Chloride-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol agar (PALCAM, AES Chemunex, Bruz, France).
- Fraser protocol: A modified version of the ISO 11290 standard method (ISO, 1996) was carried out as following. Ten grams of fresh soil was added to 90 ml of Fraser medium (AES Chemunex). This primary enrichment was incubated at 37 °C. After 48 h of incubation, 100 µl of primary enrichment was transferred in 10 ml of Fraser medium. Secondary enrichments were incubated at 37 °C during 48 h. One hundred µl of the Fraser secondary enrichment were spread on PALCAM agar.
- Cold Enrichment Protocol: Ten grams of fresh soil was added to 90 ml of Fraser. Enrichments were incubated at 4 °C for 2 months. One hundred µl of the Fraser secondary enrichment was spread on PALCAM agar.

For all enrichment protocols, PALCAM plates were inspected for presumptive *Listeria* colonies (olive green colonies surrounded by a dark halo) after 24 to 48 h of incubation at 37 °C. For each enriched soil sample, up to five well-isolated *Listeria* presumptive colonies were picked up and streaked on ALOA plate (AES Chemunex, France). On this chromogenic media *L. monocytogenes* yields blue green colonies surrounded by an opaque halo (due to lipase activity). *Listeria* sp. yields blue green colonies without an opaque halo.

#### 2.9. Confirmation of *L. monocytogenes* isolates and serovar characterization

Presumptive colonies were confirmed as *Listeria* sp. or *L. monocytogenes* by multiplex PCR using simultaneously 5 sets of primers (Doumith et al., 2004). Briefly, a 25 µl PCR reaction was set up containing: 1 × Incubation Mix, 2 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of dNTP (MP Biomedicals Illkirch, France), 1 µM of each *lmo0737*, *ORF2819* and *ORF2110* reverse and forward primers, 1.5 µM of *lmo1118* reverse and forward primers, 0.2 µM of *prs* reverse and forward primers, 0.5 U of Taq DNA polymerase (MP Biomedicals), 6.5 µl of water and 2.5 µl of genomic DNA extracted from the isolates. For negative controls, sterile water was added instead of template DNA. PCR was performed with



an initial denaturation step at 94 °C for 3 min; 35 cycles of 94 °C for 0.40 min, 53 °C for 1.15 min and 72 °C for 1.15 min; and one final cycle for 72 °C for 7 min. PCR products were resolved on a 2% agarose gel electrophoresis.

The amplification of a 370 bp fragment corresponding to the *prs* gene confirmed that isolates belong to the *Listeria* genera. Then, *L. monocytogenes* were assigned to 4 serogroups, i.e. group 1 (serovars 1/2a and 3a) was characterized by amplification of a 691 bp DNA fragment of *lmo0737*, group 2 (serovars 1/2c and 3c) was characterized by amplification of both *lmo0737* and *lmo1118* (906 bp) DNA fragments, group 3 (serovar 1/2b, 3b and 7) was characterized by amplification of a 471 bp fragment of ORF2819, and group 4 (serovar 4b, 4d and 4e) was characterized by amplification of both ORF2819 and ORF2110 (597 bp) (Doumith et al., 2004).

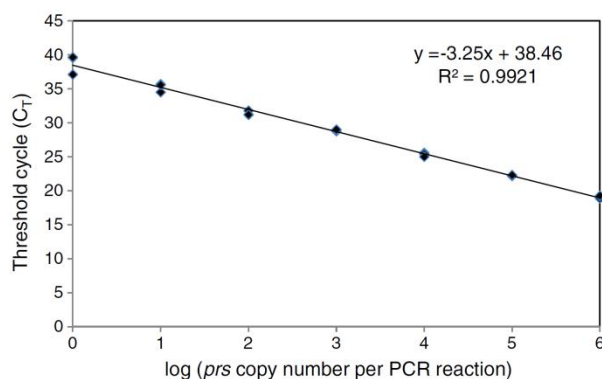
### 3. Results

In order to investigate the distribution of *L. monocytogenes* in French soils, a real-time PCR Taqman assay targeting the *prs* gene was developed for *L. monocytogenes* detection.

#### 3.1. Characteristics of the real-time PCR assay

We designed new primers and a probe that target a 68 bp region of *prs*, the gene coding for a phosphoribosylpyrophosphate synthetase. When tested on DNA's extracted from 3 *L. monocytogenes* strains ( $10^6$  genome equivalent), amplification of *prs* was detected at Ct's ranging from 19.8 to 20.9 (Table 1). At least 15 cycles separated specific amplification of *L. monocytogenes* DNA from signals detected with other bacterial species (Table 1). A signal was detected with Ct values of 36.3 and 39 for *Listeria seeligeri* and *Listeria grayi*, respectively. Similarly, Ct's were detected within the last amplification cycles for *Enterococcus faecalis* strain DSMZ 12956 (Ct = 38.7), *Staphylococcus epidermidis* strain DSMZ 20044 T (Ct = 37.6) and *Salmonella enterica* strain DSMZ 14221 (Ct = 39.8).

In order to develop a quantitative assay, a standard curve was determined with a range of dilutions of the cloned 64 bp *prs* fragment. The relationship between log (*prs* copy numbers) and Ct values was linear in the range of  $10^2$  to  $10^6$  *prs* copies/PCR reaction corresponding to Ct values of 33.3 to 19 respectively (Fig. 1). Below  $10^2$  copies, *prs* could be detected down to 1 *prs* copy but quantification was inaccurate. This standard curve was then used to quantify the number of *prs* copies in soil DNA. The *prs* copy numbers per gram of dry soil were then estimated.



**Fig. 1.** Standard curve for the real-time PCR targeting the *L. monocytogenes prs* gene. Real-time analysis of serial 10-fold dilutions of a recombinant plasmid carrying a 64-nucleotide fragment of the *prs* gene. The  $C_t$  values are plotted against the number of *prs* copies added to PCR reactions.

#### 3.2. Implementation of the real-time PCR assay to the detection of *L. monocytogenes* in soil

In order to confirm the accuracy and reliability of the *prs* TaqMan assay to detect and quantify *L. monocytogenes* in soil, microcosms spiked with  $10^1$  to  $10^6$  *L. monocytogenes* per gram of dry soil were analyzed using the real-time PCR assay. These experiments were carried out with two soils (RMQS numbers 1286 and 332). In soil 1286, *prs* was not detected in the uninoculated control microcosm. Detection of *L. monocytogenes* was unreliable in microcosms spiked with concentrations ranging from  $10^1$  to  $10^3$  CFU  $\times g^{-1}$  dry soil (Table 3A). For example, at the concentration of  $10^3$  CFU  $\times g^{-1}$  dry soil, *prs* was detected only in 4 out of 9 PCR reactions. When higher concentrations of *L. monocytogenes* were added to the microcosms (starting from  $10^4$  CFU  $\times g^{-1}$  dry soil), detection of *prs* was reliable and the population of *L. monocytogenes* could be quantified (Table 3A). In soil 332, similar results were obtained although a weak detection of *prs* occurred in 2 out of 9 PCR reactions for uninoculated control (Table 3B). Thereafter, the *prs* assay was considered reliable for the analysis of soil extracted DNA's, when the signal was detected at  $C_t$ 's below 38. Thus, the detection limit of the assay in soil was estimated to  $10^4$  CFU  $\times g^{-1}$  dry soil.

#### 3.3. Molecular detection of *L. monocytogenes* in 1315 soils from the RMQS network

Prior to the detection of the *prs* target, the presence of PCR inhibitors was investigated in the 1315 soil DNA samples. Inhibition rates ranged from 0 to 100% (Fig. 2). Most of the DNA samples (982) showed moderate inhibition rates varying between 0 and 30%. Two hundred fifty nine DNA samples displayed PCR inhibition rates over 50%. Among them, 83 soil DNAs presenting inhibition rates over 90% were removed from the study and not analyzed further. Thus, a total of 1232 soil DNA samples were screened with the real-time PCR assay targeting the *prs* gene. Seven soil DNAs gave weak amplification signal at  $C_t$ 's ranging from 37 to 42 but only one of them gave a signal above the detection limit. A second repeat of PCR reactions was realized on 600 DNA samples randomly chosen amongst the 1232 DNA samples (including those giving weak amplification signals). In this second screening, *prs* was not detected in any DNA sample. Thus, we conclude that no *prs* targets were detected reproducibly in any of the 1232 soil DNA samples tested. This indicates that *L. monocytogenes* numbers in the whole soil collection are below the detection limit ( $10^4$  CFU  $g^{-1}$  of dry soil).

#### 3.4. Occurrence of culturable *L. monocytogenes* in soils from Burgundy (culture-based approach)

Three enrichment protocols were implemented on 53 soil samples collected from 23 sites in order to assess the prevalence of *Listeria* sp. and *L. monocytogenes* in the Burgundy region. The performance to detect *L. monocytogenes* in soil depended on the enrichment procedure (Table 4). Fraser and LEB procedures allowed isolation of 18 and 19 *Listeria* sp. isolates, respectively. Among these, 4 and 5 *L. monocytogenes* strains were isolated with the Fraser and LEB procedures, respectively. On the opposite, the Fraser 4 °C procedure seemed to be less efficient for global isolation of *Listeria* sp. (9 isolates), but most of the isolates were identified as *L. monocytogenes* (7 isolates). Finally, soil samples were considered as positive when *Listeria* sp. was isolated at least from one of the 3 enrichment procedures tested. All together, 4 sites were positive for the presence of *Listeria* sp. (pasture C, pasture M, pasture R and RMQS forest soil n°1003). *L. monocytogenes* occurred in the 3 pasture soils tested (Table 5). All *L. monocytogenes* isolated from pasture C and M belong to the group 1: serovar 1/2a or 3a. Isolates from pasture R belonged to group 1: serovar 1/2a or 3a (2 isolates) and to group 4: serovar 4b or 4d or 4e (4 isolates) (Table 5).

A focus on the soil samples collected in the 3 pastures showed that the frequency of detection of *Listeria* sp. within a pasture ranged from



**Table 3**

Estimation of the detection and quantification limit of the *prs* real-time PCR TaqMan detection system with DNA extracted from control and spiked microcosms. Soil n°1286 (Panel A) and soil n°332 (Panel B). The detection limit of the real time PCR detection system was estimated to  $10^4$  CFU  $\times g^{-1}$  dry soil.

Number of <i>L. monocytogenes</i> inoculated $g^{-1}$ of dry soil	Nbr of positive PCR signals/9 reactions <sup>a</sup>	Mean $C_t$ <sup>b</sup>	Standard deviation $C_t$	Cv for $C_t$ (%)	Mean <i>prs</i> copies detected per PCR	Mean CFU $g^{-1}$ of dry soil <sup>c</sup>
<b>A)</b>						
Control soil	0/9	ND	ND	ND	ND	ND
$10^1$	1/9	40	ND	ND	ND	ND
$10^2$	0/9	ND	ND	ND	ND	ND
$10^3$	4/9	40	ND	ND	ND	ND
$10^4$	9/9	38	0.458	1.204	$13.68 \pm 3.33$	$8.03 \times 10^3 \pm 3.65 \times 10^3$
$10^5$	9/9	34	0.325	0.943	$88.45 \pm 17.58$	$5.84 \times 10^4 \pm 1.16 \times 10^4$
$10^6$	9/9	31	0.225	0.732	$678.56 \pm 106$	$4.48 \times 10^5 \pm 7 \times 10^4$
<b>B)</b>						
Control soil	2/9	40	ND	ND	ND	ND
$10^1$	3/9	41	ND	ND	ND	ND
$10^2$	2/9	40	ND	ND	ND	ND
$10^3$	3/9	40	ND	ND	ND	ND
$10^4$	9/9	38	1.079	2.836	$10.16 \pm 6.17$	$7.56 \times 10^3 \pm 4.59 \times 10^3$
$10^5$	9/9	34	0.532	1.543	$99.31 \pm 37.49$	$7.39 \times 10^4 \pm 2.79 \times 10^4$
$10^6$	9/9	30	0.314	1.030	$1396.60 \pm 313.56$	$1.04 \times 10^6 \pm 2.33 \times 10^6$

ND: Not Determined, only 0 to 4 PCR repeats out of 9 gave a weak PCR signal.

<sup>a</sup> Number of *prs* TaqMan assay giving a positive *prs* signal ( $n = 9$ ).

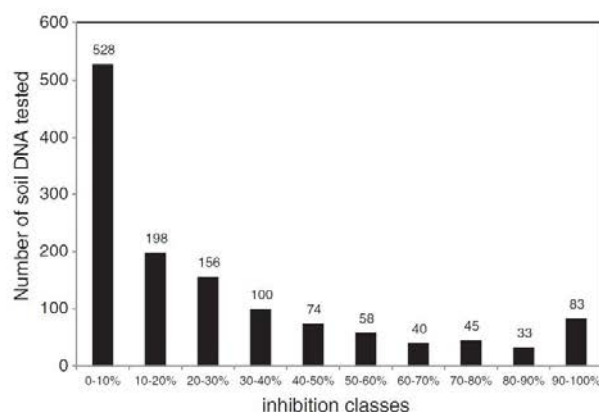
<sup>b</sup> Mean  $C_t$  values ( $n = 9$ ).

<sup>c</sup> Mean *L. monocytogenes* genome equivalent detected per gram of soil using the *prs* real-time PCR TaqMan assay ( $n = 9$ ).

69% (pasture M) to 100% (pasture R). Detection of *L. monocytogenes* ranged from 12.5% to 50% in pastures M and R, respectively.

### 3.5. Molecular detection of *L. monocytogenes* in soils from Burgundy

In order to compare culture-based detection and molecular detection, total genomic DNA was extracted from the 53 fresh soils used in Section 3.4. Occurrence of *L. monocytogenes* was then investigated in DNA extracted from the 53 fresh soils by real time PCR targeting the *prs* gene (3 PCR repeats). A reproducible positive result was obtained for one soil originated from pasture R, the average *prs* copy number was  $2.88 \times 10^4 g^{-1}$  of dry soil (Table 5). Six DNAs gave non reproducible amplification signals (1 positive out of 3 repeats, indicated as "Traces" in Table 5) with  $C_t$ 's ranging 39 to 40, and were considered as negative. The *prs* target was not detected in the other DNA extracts (Table 5).



**Fig. 2.** Influence of soil DNA extracts on the efficacy of PCR amplification of a 200 bp-fragment of the pGEM-T plasmid. The pGEM-T plasmid ( $10^6$  copies added per PCR) was amplified in the presence or in the absence of soil DNA extracts. The level of inhibition of the soil DNA extracts was determined by the ratio of the pGEM-T copy number measured in presence of soil DNA extract to the pGEM-T copy number measured in the absence of soil DNA extract (expressed in %). Due to the great number of soil DNA extracts tested, only one PCR reaction was achieved for each soil DNA sample.

## 4. Discussion

*L. monocytogenes* is a versatile bacterium that thrives in many saprophytic and *in vivo* environments. As a food borne pathogen, much attention has focused on its detection in foodstuff and in food processing facilities. Earlier studies mainly reported about the occurrence of *L. monocytogenes* in soils collected from specific environments, no global survey of soils had been realized at the scale of a whole national territory. Data on the actual incidence of *L. monocytogenes* in natural environments such as soil are scarce. The objectives of this study were: (i) to develop a molecular assay suitable for the analysis of large collections of soil samples and (ii) to test this assay on 1315 DNAs extracted from soils originating from a nationwide French soil survey. This real-time PCR TaqMan assay relies on specific detection of the *prs* target from total soil DNA. Consistent detection was achieved when at least 10 copies of the *prs* target were present in the PCR reactions. This corresponded approximately to  $10^4$  CFU (or genome equivalent) per gram of soil as demonstrated from the soil microcosm spiking experiment. This result is consistent with previously reported detection limits of *L. monocytogenes* in food matrices. Indeed, detection limits ranged 6 to 400 copies per PCR reaction for real-time PCR assay targeting *iap* and *hly* genes for the detection of *L. monocytogenes* in milk and pure culture (Bassler et al., 1995; Hein et al., 2002; Koo and Jaykus, 2003). Finally, limits of detection were calculated to be  $10^4$  CFU per gram of fresh meat and  $10^3$  CFU per gram for water, milk, soft cheese, ham, sausages and ready-to-eat salad (Rantsiou et al., 2008).

Two factors might explain the elevated detection threshold of real-time PCR assay obtained when using soil DNA. Firstly, the molecular detection of bacteria in soil might be hampered by the co-extraction of PCR inhibitors during soil DNA preparation. Although the extraction method used in this study was optimized for various soil matrices, some of the soil samples could not be analyzed due to the high degree of PCR inhibition. Soil inhibitors may hamper assay performance by various ways such as interfering in cell lyses and DNA purification, capture or degradation of DNA, denaturation or inhibition of the DNA polymerase. Among inhibitors likely to be found in soil samples, humic and phenolic compounds, heavy metals and high proportions of non-target DNA are common (Wilson, 1997). Secondly, soil microbial communities are extremely abundant and diverse (Ranjard and Richaume, 2001; Torsvik et al., 1990), thus specific targets are diluted in a complex

**Table 4**

Occurrence of culturable *Listeria* sp. and *L. monocytogenes* in fresh soil samples: comparison of enrichment procedures. The number of soil samples tested is given below the name of the site, between parentheses.

Enrichment procedure	Sampling sites									
	Pasture C (7 soils)		Pasture M (16 soils)		Pasture R (10 soils)		RMQS (20 soils)		Total (53 soils)	
	Lsp <sup>a</sup>	Lm <sup>b</sup>	Lsp	Lm	Lsp	Lm	Lsp	Lm	Lsp	Lm
LEB enrichment	5	0	7	1	7	4	0	0	18	4
Fraser enrichment	4	2	7	1	6	1	1	0	19	5
Fraser 4 °C enrichment	3	2	1	1	5	4	0	0	9	7

Lsp: *Listeria* sp.; Lm: *L. monocytogenes*.

<sup>a</sup> Number of *Listeria* sp.—positive soil samples.

<sup>b</sup> Number of *L. monocytogenes*—positive soil samples.

**Table 5**

Detection of *Listeria* sp. and *L. monocytogenes* in 53 soil samples by culture-based enrichment method or real-time PCR targeting the *prfA* gene.

Sampling sites	No. soil samples	Sample name	<i>Listeria</i> sp. <sup>a</sup>	<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>b</sup>	Serovar of <i>L. monocytogenes</i> isolates (when present)	<i>prfA</i> copy number. g <sup>-1</sup> of dry soil <sup>c</sup>
Pasture C	7	C1	+	—		ND
		C2	—	—		ND
		C3	+	+	1/2a or 3a	ND
		C4	+	—		ND
		C5	+	+	1/2a or 3a	ND
		C6	+	—		ND
		C7	+	—		ND
Pasture M	16	M1	+	—		ND
		M2	—	—		ND
		M3	—	—		Traces (1/3)
		M4	+	—		ND
		M5	+	—		ND
		M8	—	—		ND
		M9	+	—		ND
		M11	+	—		ND
		M13	+	—		Traces (1/3)
		M14	+	+	1/2a or 3a	Traces (1/3)
		M15	+	—		ND
		M16	+	—		ND
		M17	+	+	1/2a or 3a	ND
		M18	—	—		ND
Pasture R	10	M19	—	—		ND
		M20	+	—		ND
		R1	+	+	1/2a or 3a	2.88 × 10 <sup>4</sup>
		R2	+	+	1/2a or 3a	ND
					4b or 4d or 4e	
		R5	+	+	4b or 4d or 4e	Traces (1/3)
		R6	+	—		ND
		R7	+	—		ND
		R8	+	+	4b or 4d or 4e	ND
		R9	+	—		ND
RMQS	20	R10	+	+	4b or 4d or 4e	Traces (1/3)
		R11	+	—		Traces (1/3)
		R12	+	—		ND
		748	—	—		ND
		749	—	—		ND
		750	—	—		ND
		907	—	—		ND
		909	—	—		ND
		911	—	—		ND
		957	—	—		ND
		959	—	—		ND
		1003	+	—		ND
		1005	—	—		ND
		1051	—	—		ND
		1095	—	—		ND
		1137	—	—		ND
		1139	—	—		ND
		1220	—	—		ND
		1221	—	—		ND
		1222	—	—		ND
		1223	—	—		ND
		1224	—	—		ND
		1263	—	—		ND

<sup>a</sup> +, —: presence, absence of culturable *Listeria* spp. (after enrichment).

<sup>b</sup> +, —: presence, absence of culturable *Listeria monocytogenes* (after enrichment).

<sup>c</sup> Mean number of *prfA* copy between 3 replicates, quantified by RT-PCR with the *prfA* TaqMan assay in DNA extracted from soil samples. Traces: number of positive signal out of 3 replicates. ND: Under the detection limit of the *prfA* real-time PCR TaqMan assay.



metagenomic DNA extract which can decrease the sensitivity of their detection.

The overall result of this study is that the molecular detection of *L. monocytogenes* was low in a nationwide survey of French soils. Although, the detection threshold of our PCR assay in soil is in the same range as those obtained for alimentary matrices, we were unable to detect *L. monocytogenes* in the 1315 soil DNA extracts. One can speculate that this result is a coarse underestimation of the effective incidence of this pathogen in soils. Indeed, the major limitation of all PCR-based detection methods is the detection limit (at best  $10^3$  CFU per gram of matrix). Reports of the environmental occurrence of *L. monocytogenes* rely on the culture-based detection after a selective enrichment step, which suggests that the initial number is low.

Moreover, in the present study, the comparison of the results of the molecular detection and culture-based isolation on a subset of fresh soils clearly demonstrated that the PCR-based detection underestimates the actual occurrence of *L. monocytogenes* in soils (Table 5). Indeed, 17% of soils were positive for the detection of *L. monocytogenes* using culture-based detection methods while only 2% of soils were found positive by using molecular detection. This is a major finding of this work.

Previous reports demonstrated that the occurrence of this pathogen was higher in uncultivated fields (30.8% to 51.4%) lower in cultivated fields (8.3% to 18.7%) and in meadows and pastures (8.7%) (Dowe et al., 1997; Weis and Seeliger, 1975). Our data differed from these previous findings since we demonstrate that *L. monocytogenes* occurred predominantly in cow pastures. However, our results are in agreement with data from a study centered on the ecology of *L. monocytogenes* in ruminant farms, which showed that up to 35% of the soil samples were positive for the presence of the pathogen in bovine farm environment (Nightingale et al., 2004). Multiple sampling in the three pastures we included in our study showed that *L. monocytogenes* was detected in 12.5% to 50% of the samples. These results indicate that the design of the sampling procedure is critical and that collection of one localized sample per site may lead to an underestimation of the incidence of the pathogen. The fact that the soil is not an homogenous matrix and that microenvironments structure the distribution and composition of microbial communities (Dequiedt et al., 2009; Ranjard et al., 2009) should also be considered in the design of the sampling strategy to provide representative soil samples across a parcel of land; there is a strong need for the development of standardized procedures (Baker et al., 2009; Ranjard et al., 2003). Finally, seasonal fluctuations of the occurrence of *L. monocytogenes* in soil have been reported (MacGowan et al., 1994; Weis and Seeliger, 1975).

Overall, our results support the fact that French soils do not support *L. monocytogenes* populations higher than  $10^3$  to  $10^4$  CFU g<sup>-1</sup> dry soil, and that molecular detection on its own is not suitable to evaluate the environmental incidence of this pathogen; selective enrichment procedures and use of fresh soil samples are required for the detection of *L. monocytogenes* in soil. Future work should address the possibility to extract DNA from enrichment broth and detect subsequently *L. monocytogenes* by real-time PCR. Such a method might allow lowering the detection limit of molecular detection while preserving the potential for screening large soil sample collections.

## Acknowledgments

Aude Locatelli was funded by the French Agency for Environment and Energy Management (ADEME) and INRA (Environnement Agronomie Department). Part of this work was funded by the Conseil Régional de Bourgogne. This work was funded by the 'Agence Nationale de la Recherche' (ANR) (programs 07 SEST project 018-01, 05 SEST project 009-01). The RMQS network is supported by a French Scientific Group of Interest on soils: the "GIS Sol", involving the French Ministries in charge of Ecology and Agriculture, ADEME, INRA, the Institute for Research and Development (IRD) and the National Institute for Geographic

and Forest Information (IGN). We thank all the soil surveyors and technical assistants involved in sampling the sites. Special thanks are addressed to the technical assistants from the National French Soil Bank for sample handling and preparation.

## References

- Al-Ghazali, M.R., Al-Azawi, S.K., 1990. *Listeria monocytogenes* contamination of crops grown on soil treated with sewage sludge cake. J. Appl. Bacteriol. 69, 642–647.
- Baker, K.L., Langenheder, S., Nicol, G.W., Ricketts, D., Killham, K., Campbell, C.D., Prosser, J.L., 2009. Environmental and spatial characterisation of bacterial community composition in soil to inform sampling strategies. Soil Biol. Biochem. 41, 2292–2298.
- Bassler, H.A., Flood, S.J.A., Livak, K.J., Marmaro, J., Knorr, R., Batt, C.A., 1995. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3724–3728.
- Berrada, H., Soriano, J.M., Pico, Y., Manes, J., 2006. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. Int. J. Food Microbiol. 107, 202–206.
- Beuchat, L.R., 1996. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. Food Control 7, 223–228.
- Colburn, K.G., Kaysner, C.A., Abeyta, C., Wekell, M.M., 1990. *Listeria* species in a California coast estuarine environment. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2007–2011.
- Dequiedt, S., Thioulouse, J., Jolivet, C., Saby, N.P.A., Lelievre, M., Maron, P.A., Martin, M.P., Prevost-Boure, N.C., Toutain, B., Arrouays, D., Lemancau, P., Ranjard, L., 2009. Biogeographical patterns of soil bacterial communities. Environ. Microbiol. Rep. 1, 251–255.
- Dequiedt, S., Saby, N.P.A., Lelievre, M., Jolivet, C., Thioulouse, J., Toutain, B., Arrouays, D., Bispo, A., Lemancau, P., Ranjard, L., 2011. Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. Glob. Ecol. Biogeogr. 20, 641–652.
- Donnelly, C., 1999. Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. In: Ryser, E., Marth, E. (Eds.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Dekker Marcel, New York, pp. 225–260.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P., 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 42, 3819–3822.
- Dowe, M.J., Jackson, E.D., Mori, J.G., Bell, C.R., 1997. *Listeria monocytogenes* survival in soil and incidence in agricultural soils. J. Food Prot. 60, 1201–1207.
- El Marrakchi, A., Boum'handi, N., Hamama, A., 2005. Performance of a new chromogenic plating medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from marine environments. Lett. Appl. Microbiol. 40, 87–91.
- Fenlon, D.R., 1999. *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In: Ryser, E., Marth, E. (Eds.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Dekker Marcel, New York, pp. 21–37.
- Girardin, H., Morris, C.E., Albagnac, C., Dreux, N., Glaux, C., Nguyen-The, C., 2005. Behaviour of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments. FEMS Microbiol. Ecol. 54, 287–295.
- Gray, M.L., Killinger, A.H., 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. Bacteriol. Rev. 30, 309–382.
- Grolleau, E., Bargeot, L., Chafchafi, A., Hardy, R., Doux, J., Beaudou, A., Le Martret, H., Lacassin, J.C., Fort, J.L., Falipou, P., Arrouays, D., 2004. Le système d'information national sur les sols : DONESOL et les outils associés. Étude et Gestion des Sols 11, 255–269.
- Hein, I., Krismer, H., Rieck, P., Wagner, M., 2002. The use of real-time PCR for rapid detection of *L. monocytogenes* in milk and dairy products. Wien. Tierarztl. Monatsschr. 89, 312–318.
- Hitchins, A.D., 2003. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. US Food and Drug Administration's Bacteriological Analytical Manual Chapter 10. ([on line] Available in <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>).
- ISO, 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – part 1: detection method. International Standard ISO 11290–1. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jablasone, J., Warriner, K., Griffiths, M., 2005. Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. Int. J. Food Microbiol. 99, 7–18.
- Jacquet, C., Catimel, B., Brosch, R., Buchrieser, C., Dehaumont, P., Goulet, V., Lepoutre, A., Veit, P., Rocourt, J., 1995. Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. Appl. Environ. Microbiol. 61, 2242–2246.
- Janzen, M.M., Navas, J., Corujo, A., Moreno, R., Lopez, V., Martinez-Suarez, J.V., 2006. Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. Span. J. Agric. Res. 4, 235–247.
- Jolivet, C., Arrouays, D., Boulonne, L., Ratié, C., Saby, S., 2006. Le Réseau de mesures de la Qualité des sols de France (RMQS) Etat d'avancement et premiers résultats. étude et Gestion des Sols 13, 149–164.
- Koo, K., Jaykus, L.A., 2003. Detection of *Listeria monocytogenes* from a model food by fluorescence resonance energy transfer-based PCR with an asymmetric fluorogenic probe set. Appl. Environ. Microbiol. 69, 1082–1088.
- Lyautey, E., Lapein, D.R., Wilkes, G., McCleary, K., Pagotto, F., Tyler, K., Hartmann, A., Piveteau, P., Rieu, A.I., Robertson, W.J., Medeiros, D.T., Edge, T.A., Gannon, V., Topp, E., 2007. Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the South Nation River Watershed, Ontario, Canada. Appl. Environ. Microbiol. 73, 5401–5410.
- MacGowan, A.P., Bowker, K., McLauchlin, J., Bennett, P.M., Reeves, D.S., 1994. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. Int. J. Food Microbiol. 21, 325–334.

- Mead, P.S., Dunne, E.F., Graves, L., Wiedmann, M., Patrick, M., Hunter, S., Salehi, E., Mostashari, F., Craig, A., Mshar, P., Bannerman, T., Sauders, B.D., Hayes, P., Dewitt, W., Sparling, P., Griffin, P., Morse, D., Slutsker, L., Swaminathan, B., 2006. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiol. Infect.* 134, 744–751.
- Nightingale, K.K., Schukken, Y.H., Nightingale, C.R., Fortes, E.D., Ho, A.J., Her, Z., Grohn, Y.T., McDonough, P.L., Wiedmann, M., 2004. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4458–4467.
- Nogva, H.K., Rudi, K., Naterstad, K., Holck, A., Lillehaug, D., 2000. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4266–4271.
- Ranjard, L., Richaume, A.S., 2001. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res. Microbiol.* 152, 707–716.
- Ranjard, L., Lejon, D.P.H., Mougél, C., Schehrer, L., Merdinoglu, D., Chaussod, R., 2003. Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environ. Microbiol.* 5, 1111–1120.
- Ranjard, L., Dequiedt, S., Jolivet, C., Saby, N.P.A., Thioulouse, J., Harmand, J., Loisel, P., Rapaport, A., Fall, S., Simonet, P., Joffre, R., Boure, N.C.P., Maron, P.A., Mougél, C., Martin, M.P., Toutain, B., Arrouays, D., Lemanceau, P., 2009. Biogeography of soil microbial communities: a review and a description of the ongoing French national initiative. *Agron. Sustain. Dev.* 30, 359–365.
- Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P., Cocolin, L., 2008. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 99–105.
- Rocourt, J., Jacquet, C., Reilly, A., 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 197–209.
- Rossmannith, P., Krassnig, M., Wagner, M., Hein, I., 2006. Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. *Res. Microbiol.* 157, 763–771.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., Lise Daae, F., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 782–787.
- USDA, 2002. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples. *Microbiology Laboratory Guidebook* [on line]. (Available in <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgbook.htm>).
- Weis, J., Seeliger, H.P.R., 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. Microbiol.* 30, 29–32.
- Welshimer, H.J., 1968. Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation. *J. Bacteriol.* 95, 300–303.
- Welshimer, H.J., 1975. *Listeria* in nature. *Problems Listeriosis* 59–60.
- Wesley, I., 1999. Listeriosis in animals. In: Ryser, E., Marth, E. (Eds.), *Listeria. Listeriosis and Food Safety*. Dekker Marcel, New York, pp. 39–73.
- Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741–3751.



## Article 2 ó Etude de l'incidence et de la distribution d'*E. faecalis* à l'échelle du territoire français

---

### 1. Introduction

*Enterococcus faecalis* est une bactérie en forme de coque à Gram positif, anaérobie facultative, catalase-négative, non sporulée dont le génome contient un faible pourcentage G+C (37,5 à 44%). De par sa faculté à métaboliser les sucres en produisant de l'acide lactique, *E. faecalis* appartient au groupe des bactéries lactiques (Franz *et al.* 1999; Yun *et al.* 2003). *E. faecalis* a une température optimale de croissance de 35°C mais peut croître à des températures allant de 10 à 45°C (Boutibonnes *et al.* 1993). L'aptitude d'*E. faecalis* à se développer dans un milieu en présence de 6,5% de NaCl, 40% de sels biliaires et 0,1% de bleu de méthylène à un pH de 9,6 est utilisée pour isoler de manière sélective cette bactérie sur des milieux de culture. De nombreux rapports décrivent la capacité d'*E. faecalis* à résister à de fortes températures, à une osmolarité élevée, à la présence d'éthanol, de détergents, de peroxyde d'hydrogène, d'hypochlorite de sodium et de métaux lourds (Flahaut *et al.* 1996; Flahaut *et al.* 1998; Rincé *et al.* 2001; Benachour *et al.* 2005).

*E. faecalis* est une bactérie qui fait partie de la flore naturelle du tractus gastro-intestinal des hommes et des animaux à sang chaud (Franz *et al.* 1999). *E. faecalis* est l'espèce appartenant au genre *Enterococcus* majoritaire dans les excréments humains et est retrouvée à des concentrations variant de  $10^5$  à  $10^7$  par gramme de fèces (Noble 1978; Leclerc *et al.* 1996). Bien que *E. faecalis* soit fréquemment isolé dans les excréments humains, il est moins présent dans les fèces des animaux d'élevage comme les porcs, les bovins et les ovins (Leclerc *et al.* 1996; Franz *et al.* 1999). Disséminée avec les excréments humains, les déjections animales et les déchets domestiques, *E. faecalis* est souvent détectée dans l'environnement immédiat de l'homme (Byappanahalli *et al.* 2012a). C'est donc une bactérie ubiquiste retrouvée dans l'eau et les sédiments (Ferguson *et al.* 2005; Micallef *et al.* 2012), le sol (Byappanahalli *et al.* 2012b; Ran *et al.* 2013) et les végétaux (Müller *et al.* 2001; Micallef *et al.* 2012; Valenzuela *et al.* 2012). En raison de ses capacités de résistance à divers stress, *E. faecalis* et plus généralement toutes les espèces du genre *Enterococcus* sont communément

**Tableau II-6. Validation de la spécificité du système de détection *ecf* pour la détection de *E. faecalis* par PCR quantitative: souches bactériennes et valeurs de Ct correspondantes.**

Genre et espèce bactérienne	Référence souche DSMZ <sup>a</sup>	Source d'isolement	Valeur moyenne des Ct <sup>c</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	15675	Fromage à pâte molle	35
<i>Listeria monocytogenes</i>	19094	Volaille	36
<i>Listeria monocytogenes</i>	20600 <sup>T</sup>	Lapin	37
<i>Listeria grayi</i>	20601 <sup>T</sup>	Fèces de chinchilla	38
<i>Listeria innocua</i>	20649 <sup>T</sup>	Cerveau de bovin	38
<i>Listeria welshimeri</i>	20650 <sup>T</sup>	Plantes en décomposition	ND
<i>Listeria ivanovii</i>	20750 <sup>T</sup>	Mouton	38
<i>Listeria seeligeri</i>	20751 <sup>T</sup>	Sol	36
<i>Enterococcus faecalis</i>	12956	Fluide péritonéale	19
<i>Enterococcus faecalis</i>	13591	ñ il humain	19
<i>Enterococcus faecalis</i>	20371	Fluide pleurale	18
<i>Enterococcus faecalis</i>	20380	Abcès	19
<i>Enterococcus faecalis</i>	20376	Lait cru	15
<i>Enterococcus faecalis</i>	20409	NR	16
<i>Enterococcus faecalis</i>	20478 <sup>T</sup>	NR	15
<i>Enterococcus faecium</i>	20477 <sup>T</sup>	NR	33
<i>Enterococcus hirae</i>	20160 <sup>T</sup>	NR	34
<i>Enterococcus raffinosus</i>	5633 <sup>T</sup>	Culture sanguine	34
<i>Enterococcus durans</i>	20633 <sup>T</sup>	Lait déshydraté	34
<i>Enterococcus avium</i>	20679 <sup>T</sup>	Fèces d'Homme	35
<i>Enterococcus mundtii</i>	4838 <sup>T</sup>	Sol	34
<i>Enterococcus galinarum</i>	20628	Intestin de poulet	36
<i>Escherichia coli</i>	30083 <sup>T</sup>	Urine	37
<i>Escherichia coli</i>	14166	Digesteur anaérobie	36
<i>Escherichia coli</i>	3901	NR	34
<i>Escherichia coli</i>	5802	Aliment	36
<i>Escherichia coli</i>	499	NR	35
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	20044 <sup>T</sup>	Nez	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	20231 <sup>T</sup>	Fluide pleurale humain	36
<i>Staphylococcus aureus</i>	2569	Plaie	33
<i>Staphylococcus aureus</i>	6732	Pis de bovin	ND
<i>Staphylococcus capitis</i>	20326 <sup>T</sup>	Peau humaine	ND

<sup>a</sup> Les souches bactériennes ont été obtenues auprès de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Allemagne. <sup>T</sup>: Souche type.  
NR : Source d'isolement inconnue.

<sup>c</sup> Les valeurs moyennes ont été calculées à partir de Ct provenant de 3 répétitions d'analyse PCR sur les ADN des souches bactériennes pures (10<sup>6</sup> équivalents génome). ND : aucun signal PCR en temps réel détectable après 40 cycles.

utilisées comme indicateur de contamination fécale afin de tester la qualité hygiénique d'échantillons environnementaux, principalement des échantillons d'eau potable ou d'eau de baignade (USEPA 2004). Il est plus rarement recherché dans le sol comme indicateur de contamination fécale. Cependant, certaines études tendent à démontrer que la présence des entérocoques dans les ressources d'eaux douces n'est pas liée à une contamination fécale mais à une contamination environnementale (Hardina and Fujioka 1991; Fujioka *et al.* 1998; Byappanahalli *et al.* 2012b). Les auteurs suggèrent que le sol des berges avoisinant les cours d'eau est la source la plus probable de contamination. Le ruissellement d'eau sur le sol des berges conduirait au transport des entérocoques dans les cours d'eau (Hardina and Fujioka 1991; Fujioka *et al.* 1998; Byappanahalli *et al.* 2012b).

*E. faecalis* peut également se comporter comme un pathogène opportuniste. Considérée comme anodine il y a une vingtaine d'années, la bactérie *E. faecalis* est actuellement clairement identifiée comme un pathogène opportuniste qui n'affecte que les individus présentant un système immunitaire affaibli, notamment dans les milieux hospitaliers (Morrison *et al.* 1997). Elle peut être responsable d'endocardites, de bactériémies, de méningites, d'infections urinaires, et d'infections intra-abdominales (Chenoweth and Schaberg 1990; Jett *et al.* 1994). *E. faecalis* possède plusieurs facteurs de virulence qui lui permettent d'adhérer aux cellules hôtes, facilitent l'invasion des tissus, modulent la réponse immunitaire et inflammatoire, *E. faecalis* peut également causer des dommages tissulaires par l'intermédiaire de toxines sécrétées (Jett *et al.* 1994). Un autre facteur contribuant largement à la pathogénicité d'*E. faecalis* est sa résistance naturelle ou acquise à un large spectre d'antibiotique (Murray 1990; Hegstad *et al.* 2010).

Généralement, la recherche des entérocoques et d'*E. faecalis* dans les échantillons environnementaux et cliniques est réalisée par méthodes culturelles traditionnelles. Cependant, il a récemment été démontré que *E. faecalis* pouvait entrer dans un état viable non cultivable (VNC) limitant sa détection par des méthodes culturelles (del Mar Lleo *et al.* 1998; del Mar Lleo *et al.* 2000). Le stade VNC peut être considéré comme un mécanisme de survie adopté par les bactéries lorsqu'elles sont exposées à des conditions environnementales hostiles. Sous la forme VNC, *E. faecalis* n'est plus capable de croître et de former des colonies sur un milieu de culture conventionnel, la viabilité de la bactérie sous cette forme est démontrée par l'absorption active d'acides aminés qui sont incorporés dans les protéines (del Mar Lleo *et al.* 1998). De par la capacité d'*E. faecalis* à entrer dans un stade VNC, l'emploi de méthodes

**Tableau II-6 (suite). Validation de la spécificité du système de détection *ecf* pour la détection de *E. faecalis* par PCR quantitative: souches bactériennes et valeurs de Ct correspondantes.**

Genre et espèce bactérienne	Référence souche DSMZ <sup>a</sup>	Source	Valeur moyenne des Ct <sup>c</sup>
<i>Salmonella enterica</i>	10506	NR	36
<i>ssp. enterica</i> sv. <i>Typhimurium</i> LT2			
<i>Salmonella enterica</i>	19587	Tissus de cœur et de foie de poulet	37
<i>ssp. enterica</i> sv. <i>Typhimurium</i>			
<i>Salmonella enterica</i>	11320	NR	36
<i>ssp. enterica</i> sv. <i>Typhimurium</i>			
<i>Salmonella enterica</i>	50912	NR	36
<i>ssp. enterica</i> sv. <i>Typhimurium</i>			
<i>Salmonella enterica</i>	554	NR	34
<i>ssp. enterica</i> sv. <i>Typhimurium</i>			
<i>Salmonella enterica</i>	5569	NR	35
<i>ssp. enterica</i> sv. <i>Typhimurium</i>			
<i>Salmonella enterica</i>	14221	Fèces d'Homme	37
<i>ssp. enterica</i> sv. <i>Enteritidis</i>			
<i>Salmonella enterica</i>	17420	NR	35
<i>ssp. enterica</i> sv. <i>Enteritidis</i>			
<i>Salmonella enterica</i>	9898	NR	35
<i>ssp. enterica</i> sv. <i>Enteritidis</i>			
<i>Salmonella enterica</i>	14846	NR	36
<i>ssp. enterica</i> sv. <i>Choleraesuis</i>			
<i>Salmonella enterica</i>	4883	NR	34
<i>ssp. enterica</i> sv. <i>Galinarum</i>			
<i>Salmonella enterica</i>	13674	NR	38
<i>ssp. enterica</i> sv. <i>Gallinarum</i>			
<i>Salmonella enterica</i>	4224	NR	36
<i>ssp. enterica</i> sv. <i>Abony</i>			
<i>Salmonella enterica</i>	9379	NR	34
<i>ssp. enterica</i> sv. <i>Heidelberg</i>			
<i>Salmonella enterica</i>	9220 <sup>T</sup>	NR	33
<i>ssp. salamae</i>			
<i>Salmonella enterica</i>	9386 <sup>T</sup>	NR	35
<i>arizonae</i>			
<i>Salmonella bongori</i>	13772 <sup>T</sup>	NR	37
<i>Salmonella subterranea</i>	16208 <sup>T</sup>	Sédiments de sub-surface contaminés à l'uranium	36

<sup>a</sup> La totalité des souches bactériennes ont été obtenues auprès de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Allemagne. T: Souche type.

NR: Source d'isolement inconnue. <sup>c</sup> Les valeurs moyennes ont été calculées à partir de Ct provenant de 3 répétitions d'analyse PCR sur les ADN des souches bactériennes pures (10<sup>6</sup> équivalents génome). ND: aucun signal PCR en temps réel détectable après 40 cycles.



culturelles pour sa détection, notamment dans des milieux oligotrophes, peut être critiquable. L'utilisation de la PCR quantitative pour détecter et quantifier *E. faecalis* est une solution alternative qui peut éviter de sous-estimer la quantité de cette bactérie dans les échantillons. Cette méthode a déjà été appliquée pour la détection de *E. faecalis* dans les échantillons d'eau (Frahm and Obst 2003; Santo Domingo *et al.* 2003), de fumier (Klein *et al.* 2010a), de fèces (Bartosch *et al.* 2004) et certains échantillons cliniques (Sedgley *et al.* 2005) mais aucun système de détection par PCR quantitative n'a été développé pour la recherche de *E. faecalis* dans le sol (milieu très complexe de par l'abondance et la diversité des microorganismes présents).

Les objectifs de cette étude sont (i) de développer et valider un système de détection par PCR quantitative en temps réel, (ii) d'examiner l'incidence et la distribution de *E. faecalis* dans un grand échantillonnage de sols (n=1315) répartis sur le territoire français, (iii) de corréler la présence de cette bactérie avec les paramètres physico-chimiques des sols. L'incidence de *E. faecalis* a également été étudiée à la fois par méthode culturale classique et par PCR quantitative sur un ensemble réduit de sol (n=53) prélevés en Bourgogne.

## 2. Matériels et méthodes

Les méthodes utilisées dans cet article 2 sont globalement identiques à celles décrites précédemment dans la Partie II, article 1, paragraphe matériels et méthodes (Locatelli *et al.* 2013a). Seules les parties spécifiques à *E. faecalis* seront décrites en détail.

### 2.1. Souches bactériennes

Les souches employées dans cette étude proviennent de la collection de microorganismes DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Allemagne) (Tableau II-6). Les 7 souches de *E. faecalis*, incluant la souche type DSMZ 20478 ont servi de témoins positifs pour vérifier la spécificité du système de détection de PCR TaqMan, tandis que les autres souches ont servi de témoins négatifs.

## 2.2. Echantillons de sols

Les échantillons de sols employés dans cette étude sont les mêmes que ceux décrits dans la Partie II, article 1 (Locatelli *et al.* 2013a). Deux types d'échantillons de sols ont été utilisés dans cette étude :

- 1315 sols ont été sélectionnés au sein de la collection de sol du Réseau de Mesure de la qualité des sols (RMQS) (Jolivet 2006).
- 53 sols frais ont été prélevés en Bourgogne à partir de 20 sites du RMQS (dont 8 champs cultivés, 11 prairies et une forêt) et trois autres sites correspondant à des prés pâturés.

## 2.3. Extraction et purification d'ADN de sol

Les méthodes d'extractions pour les ADN génomiques des souches bactériennes, les ADN des 1315 sols secs de la collection du RMQS et les ADN des sols frais sont les mêmes que celles détaillées dans la partie II, article 1 (Locatelli *et al.* 2013a).

## 2.4. Développement du système de détection par PCR quantitative spécifique d'*E. faecalis* et quantification

Le génome de la souche V583 d'*E. faecalis* a été utilisé pour concevoir un système de détection de PCR quantitative en temps réel. Un couple d'amorce et une sonde de type TaqMan ont été développés pour amplifier un fragment du gène *ecf*, codant pour un facteur sigma-70 de fonction extra-cytoplasmique (ECF). Le couple d'amorce ECFF (5-GCTACAGAAAGCAGAATTCGAAAGA-3) et ECFR (5-CTGAAGGCCATCCAAAAAGG-3) ainsi que la sonde ECFS (5-6FAM-CCACGCGTCAAAATCCTTAATATCGGG-TAMRA-3) amplifient et mettent en évidence un fragment de 74 pb. La spécificité du système de détection conçu pour cibler l'espèce *E. faecalis* a été testée *in silico* par Blastn sur la base de données de séquences nucléotidiques.

Le mélange réactionnel, le programme d'amplification et l'appareil PCR utilisés pour réaliser les PCR quantitatives sont identiques à ceux détaillés dans la partie II, article 1 (Locatelli *et al.* 2013a).

Toutes les étapes réalisées pour construire la gamme étalon sont décrites dans la partie II, article 1 (Locatelli *et al.* 2013a). Le fragment cible *ecf* de 74 pb est amplifié à partir de l'ADN génomique de la souche type *E. faecalis* 20478<sup>T</sup> avec le couple d'amorce ECFR et ECFF. Le fragment cible est cloné dans le vecteur de clonage TOP10 puis introduit dans des cellules compétentes *E. coli*. Après extraction et purification du plasmide, des dilutions en série sont réalisées afin d'obtenir une gamme de concentration finale allant de 10<sup>6</sup> à 10<sup>0</sup> copies d'*ecf* par mélange réactionnel de PCR. La gamme étalon est réalisée en traçant le nombre de copies *ecf* en fonction de la valeur de C<sub>t</sub> (seuil cycle) obtenue après PCR. Cette gamme étalon sert de référence pour déterminer le nombre de copie d'*ecf* contenu dans les échantillons d'ADN à analyser. Les résultats sont ensuite exprimés en nombre de copie d'*ecf* par gramme de sol sec.

## 2.5. Spécificité du système de détection *ecf*

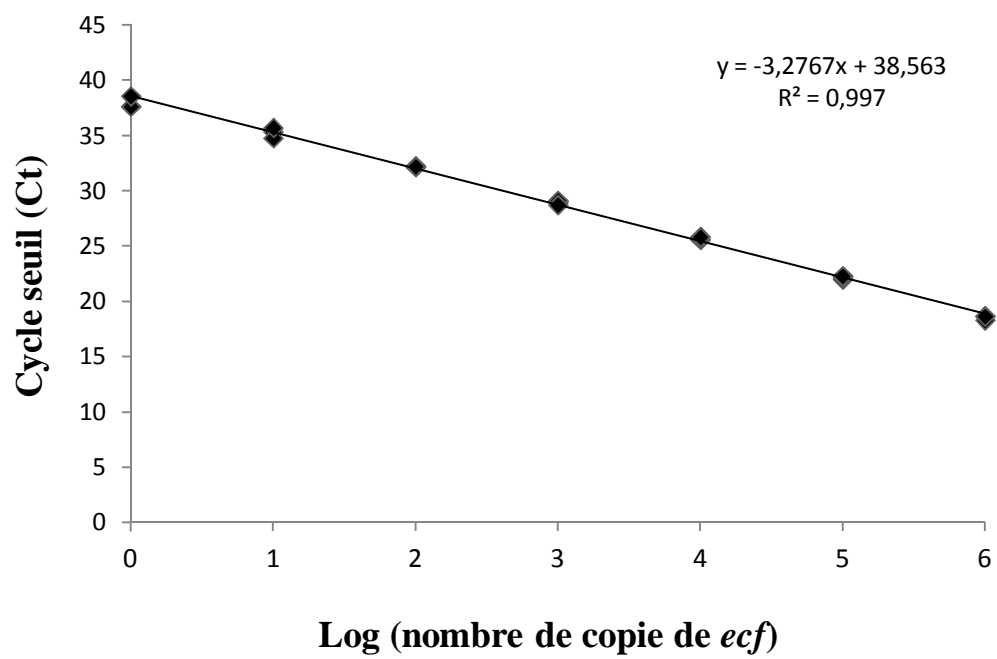
La spécificité de la PCR en temps réel a été étudiée à partir de l'ADN de 46 souches. La PCR en temps réel a été réalisée dans les conditions décrites précédemment, avec une concentration en ADN final de 10<sup>6</sup> génomes équivalents. Pour chaque ADN, des triplicats ont été réalisés.

## 2.6. Détection *E. faecalis* dans des microcosmes de sols artificiellement inoculés

Le seuil de détection du système de détection *ecf* a été déterminé comme décrit dans la partie II, article 1 (Locatelli *et al.* 2013a). Des microcosmes de sols (sols 332 and 1286) ont été inoculés avec des concentrations allant de 10<sup>2</sup> à 10<sup>6</sup> d'*E. faecalis* par gramme de sol sec. Après avoir extrait l'ADN des microcosmes de sols inoculés, le système de détection *ecf* a été utilisé pour quantifier le gène cible.

## 2.7. Détection *E. faecalis* dans des sols frais par méthode culturale (avec ou sans enrichissement)

Dix grammes de sol frais ont été ajoutés à 90 ml de TS. L'ensemble a été agité 15 min à 150 rpm. Pour un dénombrement direct *E. faecalis*, une dilution au 10<sup>ème</sup> est réalisée avec la suspension de sol puis 100 µl sont étalés sur milieu BEA (Bile Esculine Azide). L'enrichissement est réalisé en incubant la suspension de sol 24h à 44°C. L'enrichissement est ensuite dilué plusieurs fois au 10<sup>ème</sup> puis 100 µl sont étalés sur milieux BEA. Une boîte



**Figure II-3. Gamme étalon utilisée pour la quantification de *E. faecalis* dans les ADN de sols.**

témoin est ensemencée avec la souche type d'*E. faecalis* 20478<sup>T</sup> afin de pourvoir comparer l'aspect des colonies isolées à partir des sols avec les colonies de la souche type. Les colonies typiques d'entérocoques se présentent sous forme de petites colonies translucides entourées d'un halo noir. L'ensemble des boîtes est incubé 24h à 44°C. Les colonies suspectes isolées sont purifiées par ré-étalement sur milieux BEA. Afin de confirmer la présence d'*E. faecalis* dans les sols, les colonies suspectes isolées sur BEA ont été soumises à une vérification par PCR classique avec les amorces spécifiques d'*E. faecalis* ECFR et ECFE.

### 3. Résultats

#### 3.1. Validation du système de détection *ecf*

Le couple d'amorces et la sonde du système de détection *ecf* ont été conçus pour cibler un fragment interne de 74 pb d'un gène codant pour un facteur sigma-70 de fonction extra-cytoplasmique (ECF). La spécificité du couple d'amorces a été testée sur des ADN extraits d'une collection de souches bactériennes pures (Tableau II-6). L'amplification de l'ADN génomique cible d'*E. faecalis* fournit un signal à un C<sub>t</sub> compris entre 15 et 19 (Tableau II-6). Une différence d'au moins 14 cycles sépare l'amplification de l'ADN d'*E. faecalis* de l'amplification des ADN des autres espèces bactériennes testées. Les amplifications des ADN provenant de souches appartenant à d'autres espèces du genre *Enterococcus* sont caractérisées par des C<sub>t</sub> de 33 et 34 pour *E. faecium* et *E. hirae*, respectivement. Les ADN provenant des autres genres bactériens sont amplifiés à des C<sub>t</sub> d'au moins 36 pour *Listeria* spp., 34 pour *Escherichia* spp., 33 pour *Staphylococcus* spp. et *Salmonella* spp..

Une gamme étalon est préparée en diluant un plasmide contenant en insert le fragment de 74 pb du gène *ecf*. La relation entre le Log (nombre de copie d'*ecf*) et les C<sub>t</sub> correspondant est linéaire entre 10<sup>2</sup> et 10<sup>6</sup> copies d'*ecf* par mélange réactionnel de PCR (Figure II-3). En dessous de 10<sup>2</sup> copies, *ecf* peut être détecté mais la répétabilité est limitée.

**Tableau II-7. Estimation de la limite de détection et de quantification du système TaqMan *ecf* sur des ADN extraits de sols contrôles ou de sols inoculés avec des quantités connues d'*E. faecalis*. Deux sols ont été utilisés pour valider le système de détection, sol 1286 (A) et le sol 332 (B).**

A)

Nombre d' <i>E. faecalis</i> inoculé par gramme de sol sec	Nombre de signal PCR positif / 9 réactions <sup>a</sup>	C <sub>T</sub> <sup>b</sup> moyen	Ecart types des C <sub>T</sub>	Nombre moyen de copie d' <i>ecf</i> détecté par PCR	Nombre d' <i>E. faecalis</i> moyen par gramme de sol sec
Sol control	0/9	ND	ND	ND	ND
10 <sup>2</sup>	5/9	40	ND	ND	ND
10 <sup>3</sup>	9/9	38	0.737	12.85 ± 5.44	4.78x10 <sup>3</sup> ± 2x10 <sup>3</sup>
10 <sup>4</sup>	9/9	35	0.367	77.52 ± 17.87	2.88x10 <sup>4</sup> ± 6.65x10 <sup>3</sup>
10 <sup>5</sup>	9/9	32	1.033	663.82 ± 290.72	2.47x10 <sup>5</sup> ± 1x10 <sup>5</sup>
10 <sup>6</sup>	9/9	29	0.231	4.78x10 <sup>3</sup> ± 705.15	1.78x10 <sup>6</sup> ± 2.62x10 <sup>5</sup>
10 <sup>7</sup>	9/9	25	0.314	3.8x10 <sup>4</sup> ± 7.43x10 <sup>3</sup>	1.42x10 <sup>7</sup> ± 2.76x10 <sup>6</sup>

B)

Nombre d' <i>E. faecalis</i> inoculé par gramme de sol sec	Nombre de signal PCR positif / 9 réactions <sup>a</sup>	C <sub>T</sub> <sup>b</sup> moyen	Ecart types des C <sub>T</sub>	Nombre moyen de copie d' <i>ecf</i> détecté par PCR	Nombre d' <i>E. faecalis</i> moyen par gramme de sol sec
Sol control	0/9	ND	ND	ND	ND
10 <sup>2</sup>	8/9	38	ND	ND	ND
10 <sup>3</sup>	8/9	37	ND	ND	ND
10 <sup>4</sup>	9/9	35	0.464	76.11 ± 27	2.74x10 <sup>4</sup> ± 9.7x10 <sup>3</sup>
10 <sup>5</sup>	9/9	32	0.580	762 ± 434.27	2.74x10 <sup>5</sup> ± 1.5x10 <sup>5</sup>
10 <sup>6</sup>	9/9	28	0.366	6.14x10 <sup>3</sup> ± 1.6x10 <sup>3</sup>	2.21x10 <sup>6</sup> ± 5.8x10 <sup>5</sup>
10 <sup>7</sup>	9/9	25	0.267	7.5x10 <sup>4</sup> ± 1.5x10 <sup>4</sup>	2.71x10 <sup>7</sup> ± 5.39x10 <sup>6</sup>

ND : Non Déterminé

<sup>a</sup> Nombre de réaction PCR fournissant un signal positif pour la détection d'*ecf* (n=9)

<sup>b</sup> Moyenne des valeurs de C<sub>T</sub> (n=9)

### 3.2. Validation du système de détection *ecf* sur des échantillons de sol artificiellement contaminés avec *E. faecalis*

Avant d'employer le système de détection TaqMan *ecf* pour détecter et quantifier *E. faecalis* dans les échantillons de sol, le seuil de détection de ce système a été déterminé. La quantité minimale détectable d'*E. faecalis* et la précision avec laquelle le système TaqMan *ecf* quantifie cette bactérie dans le sol ont été évaluées sur des microcosmes artificiellement contaminés à des concentrations allant de  $10^2$  à  $10^7$  *E. faecalis* par gramme de sol sec. Le gène *ecf* n'est pas détecté dans les ADN extraits des sols non inoculés indiquant que le système de détection n'induit pas de signaux non spécifiques (Tableau II-7). Pour la plus faible concentration bactérienne inoculée ( $10^2$  *E. faecalis* par gramme de sol sec), le système TaqMan est capable de détecter la cible *ecf* dans au moins 50% des répétitions à des  $C_t$  compris entre 38 et 40 en fonction du sol. La détection d'*ecf* devient répétable (trois extractions indépendantes ( $n=3$ ) à partir de  $10^3$  ou  $10^4$  *E. faecalis* par gramme de sol sec pour les sols 1286 et 332 respectivement. A partir de ces concentrations, la quantité d'*E. faecalis* quantifiée avec le système TaqMan est fidèle à la concentration initialement introduite dans le sol.

Etant donné que le système de détection *ecf* ne génère pas de signaux dans les ADN des sols témoins, le seuil de détection est fixé à  $10^2$  *E. faecalis* par gramme de sol sec, concentration bactérienne la plus faible qui peut être détectée. Ce seuil de détection correspond à un  $C_t$  de 39, valeur intermédiaire entre les 2 valeurs de  $C_t$  obtenues avec les 2 sols. Pour une concentration de  $10^2$  *E. faecalis* inoculés par gramme de sol, *ecf* est au moins détecté dans 50% des répétitions. Par la suite, *E. faecalis* sera considéré comme présent dans les sols lorsque le gène *ecf* sera détecté à des  $C_t$  inférieurs ou égaux à 39 correspondant approximativement à des concentrations de  $10^2$  *E. faecalis* par gramme de sol sec

### 3.3. Recherche d'*E. faecalis* par PCR quantitative dans les sols de Bourgogne

La présence d'*E. faecalis* a été recherchée par PCR quantitative dans 53 sols frais prélevés en Bourgogne incluant 20 sols faisant partie du RMQS ainsi que 33 sols prélevés dans 3 pâtures. Les ADN ont été extraits des 53 sols frais et analysés avec le système de détection *ecf*. Trois analyses PCR ont été réalisées à partir de la même dilution d'ADN

**Tableau II-8. Détection d'*E. faecalis* par méthodes culturales (dénombrement direct et enrichissement) et par PCR quantitative avec le système de détection *ecf* dans 53 échantillons de sols frais.**

Site	Nombre d'échantillon	Nom échantillon	Dénombrement direct <sup>a</sup>	Enrichissement <sup>b</sup>	Nombre de copie d' <i>ecf</i> par gramme de sol sec <sup>c</sup>
RMQS	20	748	-	-	ND
		749	-	-	ND
		750	-	-	ND
		907	-	-	ND
		909	-	-	ND
		911	-	-	ND
		957	-	-	ND
		959	-	-	ND
		1003	-	-	ND
		1005	-	-	ND
		1051	-	-	ND
		1095	-	-	ND
		1137	-	-	ND
		1139	-	-	ND
		1220	-	-	ND
		1221	-	-	ND
		1222	-	-	ND
		1223	-	-	ND
		1224	-	-	ND
		1263	-	-	ND

<sup>a</sup> : - : absence de détection d'*E. faecalis* par dénombrement direct

NR : Non Réalisé

<sup>b</sup> : - : absence de détection d'*E. faecalis* par enrichissement

<sup>c</sup> : nombre moyen de copie d'*ecf* détecté par PCR quantitative pour 3 répétitions.

ND : Non Détecté



(Tableau II-8). Le marqueur *ecf* a été détecté de manière reproductible dans 3 échantillons prélevés dans la pâture M (M15, M16, M17) et dans 3 échantillons de sol provenant de la pâture R (R1, R2, R8). La concentration d'*E. faecalis* dans ces 6 sols varie de  $1,61 \times 10^4$  à  $5,50 \times 10^6$ . Deux ADN (C7, R12) fournissent une amplification dans 1 des 3 répétitions. Le signal est détecté à un  $C_t$  de 39, proche de la limite de détection ce qui peut justifier le manque de reproductibilité pour ces 2 échantillons d'ADN.

### 3.4. Recherche d'*E. faecalis* par méthode culturale dans 20 sols de Bourgogne

La recherche d'*E. faecalis* dans les sols par méthodes culturales (enrichissement et isolement direct) a été réalisée sur 20 sols frais prélevés en Bourgogne faisant partie du RMQS. Que ce soit par dénombrement direct ou par enrichissement, toutes les colonies suspectes obtenues sur BEA ont été analysées par PCR avec le couple d'amorce ECFR et ECFF. Aucune colonie n'a permis l'amplification du fragment *ecf* indiquant que les bactéries suspectes isolées sur les milieux BEA ne sont pas *E. faecalis* (Tableau II-8).

### 3.5. Détection d'*E. faecalis* dans 1315 sols provenant du RMQS par PCR quantitative

Deux répétitions ont été réalisées pour l'analyse des 1315 ADN de sols par PCR quantitative avec le système de détection *ecf*. Plusieurs problèmes ont été rencontrés lors de l'analyse des résultats des 2 répétitions. Un « effet plaque », se manifestant par un nombre inhabituellement important d'ADN détectés positifs pour une même plaque PCR, a été noté pour la première répétition lors de la représentation cartographique des résultats. Quatre plaques PCR regroupaient à elles seules la majorité des échantillons d'ADN détectés positifs pour *ecf*. Au vu de ce biais d'analyse, l'ensemble des résultats pour cette répétition est considéré comme peu fiable et le jeu de données correspondant n'a pas été analysé. Afin de ne pas reproduire le biais observé précédemment, une nouvelle dilution des 1315 ADN a été réalisée. De plus, les ADN ont été réorganisés aléatoirement dans les plaques PCR. Le marqueur *ecf* a été détecté à une concentration supérieure à la limite de détection dans 128 échantillons d'ADN et les résultats des analyses PCR prouvent que l'effet plaque a disparu. Cependant, une répartition géographique des sols contenant *ecf* (bande horizontale en travers du territoire national de la Bretagne à l'Alsace) difficilement explicable a été observée. Pour justifier cette répartition surprenante, des analyses statistiques (analyse en composante principale) ont été réalisées afin de corréler l'incidence du marqueur *ecf* dans les 1315 sols en

**Tableau II-8 (suite). Détection de *E. faecalis* par méthodes culturales (dénombrement direct et enrichissement) et par PCR quantitative avec le système de détection *ecf* dans 53 échantillons de sols frais.**

Site	Nombre d'échantillon	Nom échantillon	Dénombrement direct	Enrichissement	Nombre de copie d' <i>ecf</i> par gramme de sol sec <sup>c</sup>
Pâturage C	7	C1	NR	NR	ND
		C2	NR	NR	ND
		C3	NR	NR	ND
		C4	NR	NR	ND
		C5	NR	NR	ND
		C6	NR	NR	ND
		C7	NR	NR	Traces (1/3)
Pâturage M	16	M1	NR	NR	ND
		M2	NR	NR	ND
		M3	NR	NR	ND
		M4	NR	NR	ND
		M5	NR	NR	ND
		M8	NR	NR	ND
		M9	NR	NR	ND
		M11	NR	NR	ND
		M13	NR	NR	ND
		M14	NR	NR	ND
		M15	NR	NR	5,50 x 10 <sup>6</sup>
		M16	NR	NR	1,95 x 10 <sup>5</sup>
		M17	NR	NR	1,73 x 10 <sup>5</sup>
Pâturage R	10	M18	NR	NR	ND
		M19	NR	NR	ND
		M20	NR	NR	ND
		R1	NR	NR	4,17 x 10 <sup>5</sup>
		R2	NR	NR	1,61 x 10 <sup>4</sup>
		R5	NR	NR	ND
		R6	NR	NR	ND
		R7	NR	NR	ND
		R8	NR	NR	1,64 x 10 <sup>6</sup>
		R9	NR	NR	ND
		R10	NR	NR	ND
		R11	NR	NR	ND
		R12	NR	NR	Traces (1/3)

ND : Non Détecté, NR : Non Réalisé

<sup>c</sup> : nombre moyen de copie d'*ecf* détecté par PCR quantitative pour 3 répétitions.

Traces : un signal positif pour la détection d'*ecf* dans les ADN de sol sur les 3 répétitions

fonction des propriétés biotiques, abiotiques et climatiques qui les caractérisent. Aucune corrélation n'a pu être établie entre la présence du marqueur et les propriétés des sols. Pour confirmer ces résultats, une répétition partielle a été réalisée sur 637 ADN nouvellement dilués, incluant les 128 échantillons d'ADN positifs pour la détection d'*ecf*. Un échantillon d'ADN est considéré positif pour la détection d'*ecf* lorsque ce marqueur est détecté au moins une fois parmi l'analyse complète des 1315 ADN et l'analyse partielle des 637 ADN à un seuil supérieur à la limite de détection. Finalement, 184 ADN sont considérés positifs pour la détection d'*ecf* incluant 108 ADN positifs pour les 2 répétitions et 76 ADN positifs pour l'une des 2 répétitions. Les résultats de la répétition partielle viennent renforcer les résultats obtenus lors de l'analyse complète des 1315 ADN. La répartition des échantillons de sols positifs pour la détection d'*ecf* apparaît toujours suivant un axe horizontal allant de la Bretagne à l'Alsace. Comme précédemment, les paramètres biotiques et abiotiques des sols ainsi que les données climatiques n'expliquent pas l'incidence et la distribution d'*ecf* dans les sols. D'autres données relatives au prélèvement du sol (date, saison et météorologie), à l'apport de matière organique ainsi que des détails liés à l'extraction des ADN (date de l'extraction, opérateur, date de la purification, date de la réception des ADN au laboratoire) ont donc été considérées. Aucune relation ne peut être établie entre la présence d'*ecf* dans les sols et les conditions de prélèvement ni d'extraction d'ADN. Toutefois, une grande partie des ADN dans lesquels *ecf* a été détecté (79%) provient d'un lot de 198 échantillons d'ADN livrés à la même date. La supposition la plus probable pour expliquer la forte proportion d'ADN de sol positifs dans la même livraison est la contamination, suite à des négligences de manipulation, d'une partie de ces ADN par de l'ADN d'*E. faecalis* au moment de leur préparation avant la livraison ou lors de leur conservation.

Pour vérifier la théorie d'une contamination post-extraction, inhérente à la date de livraison, une nouvelle extraction d'ADN a été réalisée à partir de sols conservés à - 40°C. Un total de 150 sols a été sélectionné comprenant 72 sols précédemment considérés positifs pour la présence d'*ecf*. Trois analyses par PCR quantitative ont été réalisées pour chacun des ADN. Comme précédemment, un échantillon d'ADN est considéré positif pour la détection d'*ecf* lorsque ce marqueur est détecté au moins une fois parmi les 3 répétitions à un seuil supérieur à la limite de détection. Parmi les 150 ADN analysés, 5 ADN seulement fournissent un signal PCR faible, proche de la limite de détection, dont 2 qui apparaissaient positifs précédemment avec les ADN fournis par GenoSol.

## 4. Discussion

*E. faecalis* est une bactérie reconnue comme ubiquitaire de par la diversité des habitats environnementaux qu'elle peut coloniser (Harwood *et al.* 2004). Si *E. faecalis* a fréquemment été isolé de milieux aquatiques : eau et sédiment (Byappanahalli *et al.* 2012a) et de végétation (Micallef *et al.* 2012; Valenzuela *et al.* 2012), peu d'études s'intéressent à sa distribution dans le sol. Généralement, les travaux réalisés sur les sols concernent le dénombrement des entérocoques totaux mais ne rapportent pas le dénombrement des différentes espèces d'entérocoques (Fujioka *et al.* 1998; Byappanahalli *et al.* 2012b; Ran *et al.* 2013). De plus, l'identification des espèces d'*Enterococcus* isolées n'est pas toujours réalisée (Desmarais *et al.* 2002).

Pour quantifier *E. faecalis* dans les sols, un système de détection avec une sonde de type TaqMan a été dessiné de manière à amplifier un fragment de 74 pb situé sur un gène codant pour un facteur sigma. Le fragment ciblé n'est présent qu'une fois sur le génome d'*E. faecalis*. La spécificité du système de détection *ecf* a été validée sur un ensemble d'ADN de souches pures comprenant 7 souches de *E. faecalis* et 2 souches d'*Enterococcus* spp. L'application du système de détection sur des ADN de sols provenant de microcosmes inoculés indique que la limite de détection se situe à  $10^2$  *E. faecalis* par gramme de sol. Cependant la quantification ne devient répétable qu'à partir de  $10^3$ - $10^4$  bactéries par gramme en fonction du sol. Cette limite de détection est comparable avec celle d'une autre étude décrivant un système de détection pour *E. faecalis* dans du fumier, matrice dont la complexité est proche de celle du sol (Klein *et al.* 2010b).

Dans notre étude, le système de détection TaqMan *ecf* précédemment validé a été appliqué sur une collection de 1315 ADN de sols. La distribution géographique selon une bande horizontale des échantillons de sols positifs (n=184) pour *ecf* sur la carte de France ne peut être corrélée aux paramètres physico-chimiques, climatiques et au mode d'usage des sols. Ces résultats nous ont fait suspecter une contamination du stock initial de certains ADN. Pour vérifier cette hypothèse, les ADN de 150 sols, incluant 72 sols précédemment détectés positifs pour la présence d'*E. faecalis* ont été ré-extraits et analysés avec le système de détection *ecf*. Des signaux faibles, proches de la limite de détection sont observés pour seulement 5 des 150 ADN analysés. Parmi ces 5 ADN, 2 apparaissaient positifs précédemment mais présentaient des concentrations d'*ecf* plus élevées. Les résultats PCR

obtenus après ré-extraction ne nous permettent pas de confirmer la détection d'*E. faecalis* dans les sols lors de l'analyse des ADN fournis par GénoSol et appuient l'hypothèse d'une contamination intervenue dans le stock d'ADN initial.

Le système de détection TaqMan *ecf* a également été appliqué aux ADN extraits de 53 sols frais prélevés en Bourgogne. Le marqueur *ecf* a été détecté de manière répétable dans 6 des 53 sols analysés à des concentrations variant de  $1,6 \times 10^4$  à  $5,5 \times 10^6$  par gramme de sol. Ces 6 sols ont été prélevés dans 2 prés qui ont servi de pâture à des bovins quelques mois avant le prélèvement des sols. Le marqueur *ecf* n'est pas détecté dans les ADN extraits des 20 sols du RMQS (incluant 8 sols de cultures, 11 sols de prairies et 1 sol de forêt). Généralement, les analyses réalisées sur les sols concernent le dénombrement des entérocoques totaux. De ce fait, il nous est difficile de comparer nos résultats à la littérature existante (Mundt 1961; Fujioka *et al.* 1998; Desmarais *et al.* 2002; Byappanahalli *et al.* 2012b; Ran *et al.* 2013). Cependant, dans notre étude, les concentrations d'*E. faecalis* retrouvées dans les sols peuvent sembler supérieures aux concentrations d'entérocoques décrites dans la littérature. Dans la majorité des études, le nombre d'*Enterococcus* ne dépasse pas  $10^3$  bactéries par gramme de sol. Ces dénombrements d'entérocoques ont été réalisés dans des sols présentant une grande variété de cultures (tomate, coton, maïs, tabac, luzerne..). La prévalence de ces bactéries dans les sols est de 34% et leur concentration varie de 10 à  $10^3$  *Enterococcus* par gramme de sol (Mundt 1961). La grande majorité des échantillons de sols prélevés aux alentours d'une rivière en Floride contiennent moins de  $10^2$  *Enterococcus* par gramme de sol et leur concentration décroît avec la profondeur du sol (Desmarais *et al.* 2002). Dans certaines îles tropicales, les sols sont suspectés d'être à l'origine des contaminations des eaux douces par les entérocoques *via* le ruissellement d'eau à la surface de ces sols (Fujioka *et al.* 1998; Byappanahalli *et al.* 2012b). Sur l'île de Guam, les sols prélevés en surface présentent des concentrations de 700 entérocoques par gramme de sol. Ces concentrations s'abaissent à 20-60 entérocoques par gramme à des profondeurs de sol de 18 cm et 36 cm. Dans une étude similaire, 62 sols représentatifs des différents types de sols rencontrés à Hawaï ont été analysés pour la présence d'entérocoques (Byappanahalli *et al.* 2012b). Les entérocoques sont retrouvés dans 98 % des échantillons de sol analysés. Il n'y a pas de différence significative de la concentration des entérocoques entre les différents types de sol et la densité moyenne est d'environ  $9,8 \times 10^2$  bactéries par gramme de sol. Parmi les isolats d'*Enterococcus* provenant de ces sols, 23% ont été identifiés comme des *E. faecalis* (Byappanahalli *et al.* 2012b). La

structure de la population d'entérocoques a été étudiée dans le sol provenant de 2 sites à proximité du lac supérieur aux Etats-Unis. La concentration d'entérocoques varie de  $7,1 \times 10^1$  à  $5,6 \times 10^5$  pour 100 grammes de sol sec. *E. faecalis* représente 14,5% et 48,8% des *Enterococcus* isolés des 2 sites (Ran *et al.* 2013).

Plusieurs explications peuvent être émises pour interpréter les plus fortes concentrations d'*E. faecalis* dans les sols de notre étude par rapport à la littérature. D'une part, les échantillons de sols dans lesquels *E. faecalis* a été détecté proviennent de 2 prés servant de pâtures à des bovins. Or, les fèces de bovins peuvent contenir *E. faecalis* à des concentrations pouvant atteindre  $10^6$  bactéries par gramme (Klein *et al.* 2010a). La présence ponctuelle de fortes concentrations d'*E. faecalis* dans les échantillons de sols provenant de pâtures peut donc être liée à une contamination fécale provenant des bovins tandis que dans les autres études, aucune contamination fécale n'est associée à la présence des entérocoques. D'autre part, nous avons utilisé une approche par PCR quantitative pour estimer la concentration d'*E. faecalis* dans les sols contrairement aux autres études qui emploient des méthodes culturales classiques avec des milieux liquides ou solides sélectifs (filtration sur membrane, Nombre le Plus Probable, enrichissement, dénombrement direct). Nous pouvons supposer que la quantité d'*E. faecalis* détectée dans les ADN de sols peut être surestimée par la méthode de détection moléculaire de par la quantification possible de cellules d'*E. faecalis* sous la forme VNC et/ou la quantification d'ADN provenant de cellules d'*E. faecalis* mortes.

La présence d'*E. faecalis* a été recherchée par méthode culturale sur milieu BEA dans les 20 sols frais provenant du RMQS. Bien que certaines colonies présentent un halo noir sur milieu BEA, aucune des bactéries n'est confirmée comme appartenant à l'espèce *E. faecalis*. Ces résultats obtenus par méthodes culturales sont cohérents avec les résultats de PCR quantitative car le marqueur *ecf* n'est détecté dans aucun des ADN provenant de ces sols.

## 5. Références bibliographiques

**Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G. T. & McMurdo, M. E. T. (2004).** Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and environmental microbiology* **70**, 3575-3581.

**Benachour, A., Muller, C., Dabrowski-Coton, M., Le Breton, Y., Giard, J.-C., Rincé, A., Auffray, Y. & Hartke, A. (2005).** The *Enterococcus faecalis* SigV protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to survival following heat, acid, and ethanol treatments. *Journal of bacteriology* **187**, 1022-1035.

**Boutibonnes, P., Giard, J. C., Hartke, A., Thammavongs, B. & Auffray, Y. (1993).** Characterization of the heat shock response in *Enterococcus faecalis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**, 47-55.

**Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R. & Harwood, V. J. (2012a).** Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**, 685-706.

**Byappanahalli, M. N., Roll, B. M. & Fujioka, R. S. (2012b).** Evidence for occurrence, persistence, and growth potential of *Escherichia coli* and enterococci in Hawaii's soil environments. *Microbes and Environments* **27**, 164-170.

**Chenoweth, C. & Schaberg, D. (1990).** The epidemiology of enterococci. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **9**, 80-89.

**del Mar Lleo, M., Tafi, M. C. & Canepari, P. (1998).** Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growth. *Systematic and applied microbiology* **21**, 333-339.

**del Mar Lleo, M., Pierobon, S., Tafi, M. C., Signoretto, C. & Canepari, P. (2000).** mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Applied and environmental microbiology* **66**, 4564-4567.

**Desmarais, T. R., Solo-Gabriele, H. M. & Palmer, C. J. (2002).** Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1165-1172.

**Ferguson, D. M., Moore, D. F., Getrich, M. A. & Zhouwandai, M. H. (2005).** Enumeration and speciation of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 598-608.

**Flahaut, S., Frere, J., Boutibonnes, P. & Auffray, Y. (1996).** Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Applied and environmental microbiology* **62**, 2416-2420.

**Flahaut, S., Laplace, J. M., Frere, J. & Auffray, Y. (1998).** The oxidative stress response in *Enterococcus faecalis*: relationship between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress proteins. *Letters in applied microbiology* **26**, 259-264.

**Frahm, E. & Obst, U. (2003).** Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *Journal of microbiological methods* **52**, 123-131.

**Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H. & Stiles, M. E. (1999).** Enterococci at the crossroads of food safety? *International journal of food microbiology* **47**, 1-24.

**Fujioka, R., Sian-Denton, C., Borja, M., Castro, J. & Morphey, K. (1998).** Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and enterococci in Guam's streams. *Journal of applied microbiology* **85**, 83S-89S.

**Hardina, C. M. & Fujioka, R. S. (1991).** Soil: The environmental source of *Escherichia coli* and enterococci in Hawaii's streams. *Environmental Toxicology and Water Quality* **6**, 185-195.

**Harwood, V. J., Delahoya, N. C., Ulrich, R. M., Kramer, M. F., Whitlock, J. E., Garey, J. R. & Lim, D. V. (2004).** Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources. *Letters in Applied Microbiology* **38**, 476-482.

**Hegstad, K., Mikalsen, T., Coque, T. M., Werner, G. & Sundsfjord, A. (2010).** Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection* **16**, 541-554.

**Jett, B. D., Huycke, M. M. & Gilmore, M. S. (1994).** Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* **7**, 462-478.

**Jolivet, C., D. Arrouays, L. Boulonne, C. Ratié and S. Saby (2006).** Le Réseau de mesures de la Qualité des sols de France (RMQS) Etat d'avancement et premiers résultats. *étude et Gestion des Sols* **13**, 149-164.

**Klein, M., Brown, L., Tucker, R. W., Ashbolt, N. J., Stuetz, R. M. & Roser, D. J. (2010a).** Diversity and abundance of zoonotic pathogens and indicators in manures of feedlot cattle in australia. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 6947-6950.

**Klein, M., Brown, L., van den Akker, B., Peters, G. M., Stuetz, R. M. & Roser, D. J. (2010b).** Monitoring bacterial indicators and pathogens in cattle feedlot waste by real-time PCR. *Water research* **44**, 1381-1388.

**Leclerc, H., Devriese, L. A. & Mossel, D. A. A. (1996).** Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *Journal of Applied Microbiology* **81**, 459-466.

**Locatelli, A., Depret, G., Jolivet, C., Henry, S., Dequiedt, S., Piveteau, P. & Hartmann, A. (2013).** Nation-wide study of the occurrence of *Listeria monocytogenes* in French soils using culture-based and molecular detection methods. *Journal of microbiological methods*.

**Micallef, S. A., Rosenberg Goldstein, R. E., George, A., Ewing, L., Tall, B. D., Boyer, M. S., Joseph, S. W. & Sapkota, A. R. (2012).** Diversity, distribution and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. recovered from tomatoes, leaves, water and soil on US mid-atlantic farms. *Food Microbiology*.



- Morrison, D., Woodford, N. & Cookson, B. (1997).** Enterococci as emerging pathogens of humans. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 89S-99S.
- Müller, T., Ulrich, A., Ott, E.-M. & Müller, M. (2001).** Identification of plant-associated enterococci. *Journal of applied microbiology* **91**, 268-278.
- Mundt, J. O. (1961).** Occurrence of enterococci: bud, blossom, and soil studies. *Applied microbiology* **9**, 541-544.
- Murray, B. E. (1990).** The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical microbiology reviews* **3**, 46-65.
- Noble, C. J. (1978).** Carriage of group D streptococci in the human bowel. *Journal of clinical pathology* **31**, 1182-1186.
- Ran, Q., Badgley, B. D., Dillon, N., Dunny, G. M. & Sadowsky, M. J. (2013).** Occurrence, genetic diversity, and persistence of enterococci in a lake superior watershed. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Rincé, A., Giard, J.-C., Pichereau, V., Flahaut, S. & Auffray, Y. (2001).** Identification and characterization of *fgsp65*, an organic hydroperoxide resistance (*ohr*) gene encoding a general stress protein in *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology* **183**, 1482-1488.
- Santo Domingo, J. W., Siefring, S. C. & Haugland, R. A. (2003).** Real-time PCR method to detect *Enterococcus faecalis* in water. *Biotechnology letters* **25**, 261-265.
- Sedgley, C. M., Nagel, A. C., Shelburne, C. E., Clewell, D. B., Appelbe, O. & Molander, A. (2005).** Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Archives of oral biology* **50**, 575-583.
- USEPA (2004).** Water quality standards for coastal and great Lakes recreation waters. *Environmental Protection Agency*, 67218-67243.
- Valenzuela, A. S., Benomar, N., Abriouel, H., Pulido, R. P., Canamero, M. M. & Galvez, A. (2012).** Characterization of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from wild flowers. *Antonie van Leeuwenhoek* **101**, 701-711.
- Yun, J.-S., Wee, Y.-J. & Ryu, H.-W. (2003).** Production of optically pure l (+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enzyme and microbial technology* **33**, 416-423.

# **Partie III**

## ***Résultats***

**Impact des facteurs biotiques et abiotiques  
sur la survie de *L. monocytogenes* et d'*E.*  
*faecalis* dans les sols**

## Partie III : Résultats ó Impact des facteurs biotiques et abiotiques sur la survie de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis* dans les sols

La troisième partie de ma thèse présente les résultats obtenus sur les capacités de survie des espèces *L. monocytogenes* et *E. faecalis* en fonction des propriétés biotiques et abiotiques des sols.

Cette partie regroupe 2 articles :

- **L'article 3** est focalisé sur l'effet des paramètres édaphiques sur la survie de *L. monocytogenes* dans les sols. Les résultats obtenus ont été valorisés sous forme d'article accepté pour publication dans le journal PloS one.
- **L'article 4** décrit l'effet des paramètres édaphiques sur la survie d'*E. faecalis* dans les sols et compare les résultats avec ceux obtenus pour *L. monocytogenes*. Cet article fera l'objet d'une prochaine publication

La démarche expérimentale employée pour l'étude de la survie de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis* est identique :

- Une collection de 100 sols provenant du RMQS et fournis par l'unité Infosol d'Orléans a été sélectionnée pour ce travail. Ces 100 sols présentent des caractéristiques pédologiques variées et correspondent à différents modes d'usage.
- Des mutants spontanés de *L. monocytogenes* souche EGDe et d'*E. faecalis* souche DSM 20478<sup>T</sup> résistants à la rifampicine ont été inoculés dans des microcosmes de sols. La survie de ces 2 bactéries a été suivie au cours du temps par dénombrement sur milieu gélosé.
- Des microcosmes de sols stériles réalisés sur un sous-ensemble de 9 sols ont été réalisés afin d'observer l'effet de la microflore endogène du sol sur la survie des 2 bactéries.
- Finalement, des analyses statistiques ont été réalisées afin d'identifier les paramètres édaphiques déterminant la survie de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis* dans les sols.

### **Article 3 ó Biotic and abiotic soil properties influence survival of *Listeria monocytogenes* in soil**

---

Aude LOCATELLI<sup>1</sup>, Aymé SPOR<sup>1</sup>, Claudy JOLIVET<sup>2</sup>, Pascal PIVETEAU<sup>1-3</sup> and Alain HARTMANN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR1347 Agroécologie, F-21065 Dijon, France

<sup>2</sup> INRA, US-1106 InfoSol, BP20619, F-45075 Orléans, France

<sup>3</sup> Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, Dijon, France

Keywords: *Listeria monocytogenes*, survival, pH, endogenous microbiota, basic cation saturation ratio, French soil monitoring network

Corresponding author: Dr. Alain Hartmann

INRA Dijon, UMR1347 Agroécologie, 17 rue Sully BP86510, 21065 Dijon Cédex, France

Tel +33 (0) 3 80 69 32 95, Fax +33 (0) 3 80 69 32 24

## ABSTRACT

*Listeria monocytogenes* is a food-borne pathogen responsible for the potentially fatal disease listeriosis and terrestrial ecosystems have been hypothesized to be its natural reservoir. Therefore, identifying the key edaphic factors that influence its survival in soil is critical. We measured the survival of *L. monocytogenes* in a set of 100 soil samples belonging to the French Soil Quality Monitoring Network. This soil collection is meant to be representative of the pedology and land use of the whole French territory. The population of *L. monocytogenes* in inoculated microcosms was enumerated by plate count after 7, 14 and 84 days of incubation. Analysis of survival profiles showed that *L. monocytogenes* was able to survive at long term (up to 84 days) in 71% of the soils tested, in the other soils (29%) only a short-term survival (up to 7 to 14 days) was observed. Using variance partitioning techniques, we showed that about 65% of the short-term survival ratio of *L. monocytogenes* in soils was explained by the soil chemical properties, amongst which the basic cation saturation ratio seems to be the main driver. On the other hand, while explaining a lower amount of survival ratio variance (11%), soil texture and especially clay content was the main driver of long-term survival of *L. monocytogenes* in soils. In order to assess the effect of the endogenous soils microbiota on *L. monocytogenes* survival, sterilized versus non-sterilized soils microcosms were compared in a subset of 9 soils. We found that the endogenous soil microbiota could limit *L. monocytogenes* survival especially when soil pH was greater than 7, whereas in acidic soils, survival ratios in sterilized and unsterilized microcosms were not statistically different. These results point out the critical role played by both the endogenous microbiota and the soil physic-chemical properties in determining the survival of *L. monocytogenes* in soils.

## INTRODUCTION

*Listeria monocytogenes* is a food-borne pathogen responsible for listeriosis a potentially fatal disease that results in meningitis, septicemia or abortion (Farber and Peterkin 1991; Low and Donachie 1997b). This disease can affect humans and a large range of wild and domestic animals (Wesley 1999). Outbreaks of human listeriosis have been reported worldwide and are mainly associated with consumption of various contaminated food such as meat, dairy products, vegetables and fish (Jacquet *et al.* 1995; Beuchat 1996; Rocourt *et al.* 2000; Mead *et al.* 2006). Ready-to-eat food products, which are consumed without further cooking, are most likely at the origin of listeriosis outbreaks (Aureli *et al.* 2000; Sim *et al.*

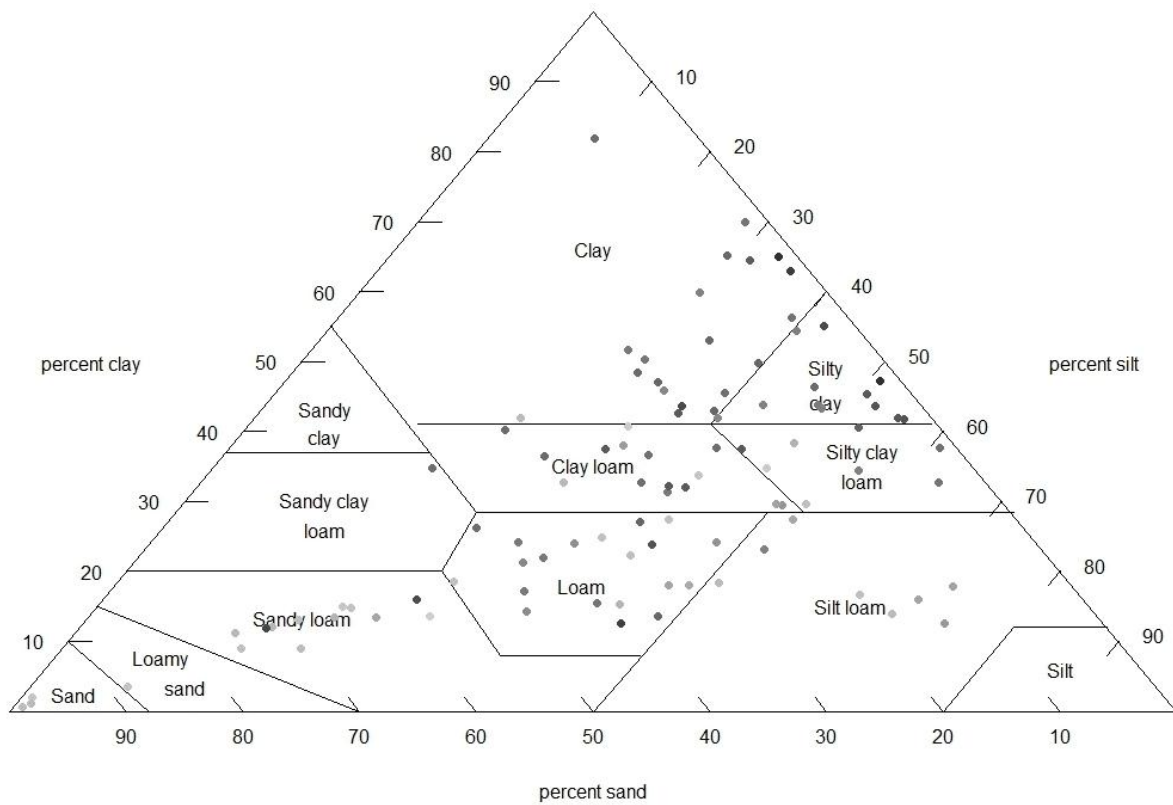
2002; Guenther *et al.* 2009; Gaul *et al.* 2013). Although listeriosis infections are uncommon, mortality rates can reach 30% in at-risk people (Slutsker and Schuchat 1999; Siegman-Igra *et al.* 2002; Wing and Gregory 2002). As a consequence, *L. monocytogenes* is recognized as one of the most important food-borne pathogen.

*L. monocytogenes* is widely distributed in nature including vegetation (Welshimer 1968; Weis and Seeliger 1975), water (Lyautey *et al.* 2007), sediment (Colburn *et al.* 1990; El Marrakchi *et al.* 2005) and soil (Weis and Seeliger 1975; Welshimer 1975). Although *L. monocytogenes* is ubiquitous in the environment, human and animals are likely to be an important reservoir (Wesley 1999; Grif *et al.* 2003; Borucki *et al.* 2005). *L. monocytogenes* has been isolated from livestock, domestic and wild animals in both infections and latent states (Gray 1966; Wesley 1999), in animal feces and in the close environment of animals (Nightingale *et al.* 2004). The incidence of *L. monocytogenes* is generally higher in fecal sample of healthy cattle (33%) than in sheep (8%) or pig (5.9%) (Wesley 1999). This finding is consistent with other studies reporting a significantly higher prevalence of *L. monocytogenes* positive samples in bovine farms than in small ruminant farms without listeriosis cases (Nightingale *et al.* 2004). In British-fresh livestock manure, prevalence of *Listeria* spp. (including *L. monocytogenes* and *L. ivanovii*) is globally higher in cattle (29.8%) and sheep (29.2%) than in pig (19.8%) and poultry (19.4%) wastes with levels ranging from  $2 \times 10^2$  to  $1 \times 10^3$  *Listeria* spp. per gram of manure (Hutchison *et al.* 2005).

Farm environments are potential sources of *L. monocytogenes* and may contribute to the contamination of vegetables at the pre-harvest stage. *L. monocytogenes* is frequently isolated from a large variety of vegetables collected in farms (Aytac *et al.* 2010; Jeyaletchumi *et al.* 2011). One of the first potential sources of vegetable contamination at the preharvest stage (in the field) is soil when seeds are sown. In addition, some agricultural practices such as recycling animal feces as crop fertilizers or irrigation with contaminated water may increase the risk of soil and vegetable contamination. Soil fertilized with sludge cake can contaminate parsley seeds with *L. monocytogenes* which can be detected until plant harvesting (Al-Ghazali and Al-Azawi 1990). Finally, direct transfer of *L. monocytogenes* from amended soil to seeds of carrots, lettuce, radish, spinach and tomato has been described (Jablasone *et al.* 2005). Recent field experiment has shown that the transfer of the pathogen surrogate *Listeria innocua* from contaminated soil to parsley leaves can occur by splashing due to rain and irrigation (Girardin *et al.* 2005).

Public health hazard linked with transmission of pathogens from soil to plants and vegetables is relevant only if the pathogen is able to survive long enough in soil. Previous studies have investigated which soil properties might impact *L. monocytogenes* survival. Survival studies were performed either by direct inoculation of *L. monocytogenes* in soil or by adding contaminated fertilizer in soil. First, survival of *L. monocytogenes* is not significantly affected by the type of livestock manure added to soil (Dowe *et al.* 1997; Nicholson *et al.* 2005). Soil type had a strong effect on *L. monocytogenes* survival. *L. monocytogenes* survived better in a fertile soil (up to 295 days) than in a clay soil (at 24-26°C) (Welshimer 1960). *L. monocytogenes* population was stable in clay soils, significantly decrease in sandy soils, while displaying an intermediary survival in sandy loam soils up to 30 days (Dowe *et al.* 1997). Regardless of the type of manure spread on soil, *L. monocytogenes* persisted over 32 days in a clay loam grassland soil while survival was lower in a sandy arable soil (Nicholson *et al.* 2005). Soil pH seems to be determinant for *L. monocytogenes* persistence which can survive more than 32 days in 2 soils harboring pH of 6.5 and 6.9 (Nicholson *et al.* 2005). On the contrary, *L. monocytogenes* EGDe did not persist more than 6 days at 25°C in a forest soil characterized by a low pH (5.22) (McLaughlin *et al.* 2011). The rapid decline observed in this study, can be explained by the low pH of the soil. Higher survival of *L. monocytogenes* was observed at low temperature (McLaughlin *et al.* 2011). Soil microflora appears to have an impact on *L. monocytogenes* survival. Generally, suppression of microflora via soil sterilization allowed a better growth of *L. monocytogenes* than in the presence of a competitive microflora (Botzler *et al.* 1974; Dowe *et al.* 1997; McLaughlin *et al.* 2011). Biotic and abiotic soil parameters also affect the persistence in soils of pathogenic bacteria belonging to the Enterobacteriaceae family, for example, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* (Mubiru *et al.* 2000; Nicholson *et al.* 2005; Franz *et al.* 2008).

Generally, studies reporting the survival of pathogenic bacteria in soil, including *L. monocytogenes*, were focused on a limited number of poorly characterized soils (Botzler *et al.* 1974; Dowe *et al.* 1997; Mubiru *et al.* 2000; Nicholson *et al.* 2005; Franz *et al.* 2008). Identification of the soil abiotic and biotic parameters influencing the survival of pathogenic bacteria in terrestrial ecosystems will help understanding their cycle of contamination in the environment. The objective of this study was to assess the survival of *L. monocytogenes* in a large collection (n=100) of well characterized soils collected throughout France and representative of the pedology and land use of the whole territory. ANOVA and variance



**Figure III-1. Distribution of the 100 soils in the textural triangle.**

Survival ratio of *L. monocytogenes* in soils at day 84 are expressed as grey level (light grey corresponding to low survival ratios and dark grey corresponding to high survival ratios)



partitioning were used to correlate 40 soil parameters with *L. monocytogenes* survival ratios in order to identify parameters that determine the fate of *L. monocytogenes* in soil.

## MATERIALS AND METHODS

### *Soil samples*

One hundred soil samples were randomly chosen among the soil library of the French Soil Quality Monitoring Network (RMQS, Réseau de Mesure de la Qualité des Sols) (Jolivet 2006; Ranjard *et al.* 2009). Soils were collected from 2001 to 2010 following a single sampling procedure. Soil sample preparation and storage were achieved according to ISO and AFNOR standards : NF ISO 10381-1 (ISO10381-1 2002) and ISO 10381-6 (NFISO10381-6 2009). A large range of physical (particle-size) and chemical parameters (pH, organic C, N, exchangeable cations and cation exchange capacity (CEC)) were measured for each soil by the Soil Analysis Laboratory of INRA (Arras, France, <http://www.lille.inra.fr/las>). In addition, 2 variables were calculated from measured parameters: (i) C/N ratio and (ii) Base Cation Saturation Ratio (%) determined by the sum of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$  divided by CEC and multiplied by 100. Supplementary information such as climatic data (monthly rain, evapotranspiration (ETP) and temperature) and detailed land cover are available at the DONESOL database ([http://www.gissol.fr/programme/rmq/RMQS\\_manuel\\_31032006.pdf](http://www.gissol.fr/programme/rmq/RMQS_manuel_31032006.pdf) (Grolleau 2004; Ranjard *et al.* 2013)). All parameters characterizing the 100 soils used in this study, including soil texture, soil chemistry, land-use, climatic data and spatial localization are detailed as supporting information (Table S1)<sup>1</sup>. Moreover, the textural classification of the 100 soils is represented in supplementary figure (Figure III-1).

### *Bacterial strain and culture conditions*

The rifampicin-resistant ( $\text{Rif}^{\text{R}}$ ) mutant L9 of wild-type strain *L. monocytogenes* EGDe was used in this study (Lemunier *et al.* 2005). Stock cultures were prepared by growing *L. monocytogenes*  $\text{Rif}^{\text{R}}$  in Tryptone Soy Broth (TSB, AES Chemunex, Bruz, France) at 37°C. After washing in sterile water, the cell pellet was suspended in a Brain Heart Infusion (BHI, AES Chemunex, Bruz, France) with 25% of glycerol, aliquoted (200 µl in microtubes) and

---

<sup>1</sup> Table S1 disponible en ligne lorsque l'article sera paru sur <http://www.plosone.org/>

**Table III-1. Land use and main edaphic factors of the subset of nine soils.**

<b>Soil n°</b>	<b>Land use</b>	<b>pH</b>	<b>Clay content (g/kg soil)</b>	<b>Silt content (g/kg soil)</b>	<b>Sand content (g/kg soil)</b>
<b>765</b>	Grassland	4.7	121	164	715
<b>1709</b>	Grassland	4.7	185	288	527
<b>2191</b>	Grassland	5.9	374	440	186
<b>921</b>	Culture	7	454	508	38
<b>1492</b>	Culture	7.9	403	223	374
<b>1500</b>	Culture	5.3	150	210	640
<b>755</b>	Forest	7	650	334	16
<b>881</b>	Forest	4.7	153	446	401
<b>1133</b>	Forest	5.6	819	92	89

frozen -80°C until further utilization. Pre-cultures were prepared by inoculating 20 ml of TSB inoculated with 200 µl of the stock culture. After 48H of incubation at 20°C, pre-cultures were centrifuged (10,000 g, 5 min), pellets were washed and re-suspended in 20 ml of physiological saline solution (8.5 g/L NaCl). Cell density was estimated spectrophotometrically and pre-cultures were diluted with physiological saline solution to a final inoculum concentration of  $1.6 \times 10^7$  *L. monocytogenes* per ml.

### ***Microcosms preparation and inoculation***

Microcosms were prepared in sterile flasks (40 ml) using 2 grams of carefully mixed and homogenized soil taken from the initial stock (100 grams).

To test the effect of biotic factors, a subset of nine soils were sterilized by gamma-radiation. These soils were chosen for their contrasted physico-chemical and land use characteristics (Table III-1). Two grams of soil were conditioned in a 40 ml-flask. For each soil, 9 individual microcosms were prepared (3 sampling days and 3 replicates). All 81 (9 x 9) soil microcosms were packed in a box and send to Ionisos for gamma radiation sterilization (Dagneux, France). The entire box was sterilized without being open by receiving an external minimum dose of 45 KGray and an external maximum dose of 60 KGray.

Soil microcosms were adjusted to 80% of the water field capacity one week before inoculation. Water field capacity was determined by granulometric method taking into account clay, fine silt and organic matter content of each soil. For all tested soils, one individual microcosm was prepared for each sampling time. One hundred and twenty µl of inoculum was added to each microcosm giving concentrations of  $1 \times 10^6$  *L. monocytogenes* per gram of dry soil. Due to the large number of soils tested only one repeat was realized, however the reproducibility of the method was evaluated on a subset of 9 soils for which three repeats were realized. On the subset of nine soils, three independent flasks were inoculated for each soil condition (sterilized or non-sterilized). For each sterilized soil, uninoculated microcosms remained sterile for the whole duration of the experiment (84 days), thus proving that gamma irradiation eradicated all microorganisms and that no recontamination of microcosms occurred during the experiment. Soil microcosms were incubated at 20°C and were sampled 1h (*i.e.* survival ratio at  $t_0$ ), 7, 14 and 84 days after inoculation. All viable counts were expressed per gram of dry soil.

Total cultivable soil bacteria were enumerated on one tenth-strength Nutrient Agar medium supplemented with 100 mg/L of cycloheximide for non-sterile soil microcosms at each sampling time (from day 0 to day 84 after inoculation).

#### ***Monitoring *L. monocytogenes* survival by viable plate count***

Eighteen ml of Tryptone Salt (TS, 1 g/L tryptone, 8.5 g/L NaCl) was added to each microcosm and bacteria were resuspended by shaking 10 min, 150 rpm, 20°C. This suspension was serially diluted and plated on Polymyxin-Acriflavin-Lithium-Chloride-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol agar (PALCAM, AES Chemunex, Bruz, France) supplemented with rifampicin and cycloheximide each at 100 mg/L and incubated at 37°C. Appropriate dilutions were plated on PALCAM medium. When high levels of *L. monocytogenes* are expected in soil, 10 x 10 µL were spotted for each dilution level (Detection limit = 100 bacteria per gram of dry soil), while when less than 100 *L. monocytogenes* per gram of soil was expected, 1 ml of the soil suspension was poured into the medium (Detection limit = 10 bacteria per gram of dry soil). Uninoculated control experiments were processed accordingly to verify that *L. monocytogenes* was not initially detected in uninoculated soils.

#### ***Statistical analyses of the survival data***

Survival ratios were calculated as follows prior to the analyses to make them closely conform to a Gaussian distribution:

$$11_{1_1} = 11_{1_1} \cdot \frac{11_{1_1}}{11_{1_1}}$$

Where  $11_{1_1}$  is the survival ratio at time  $t_x$  ( $x = 7$  days, 14 days or 84 days),  $11_{1_1}$  is the number of Colony Forming Units at time  $t_x$  and  $11_{1_1}$  is the number of Colony Forming Units at time  $t_0$ .

#### ***Replicated experiment: pH, land use and sampling day accounting for variation of *L. monocytogenes* survival ratio in sterilized and non-sterilized soils***

A repeated-measures ANOVA was performed on the survival ratios. Factors accounting for variation of the survival ratio were the pH of the soils (treated as an ordinal variable:  $\text{pH} < 5.5$ ;  $5.5 < \text{pH} < 7$ ;  $\text{pH} > 7$ ), the presence or absence of soil microflora (non-sterilized versus sterilized soil), the land use (culture, forest and grassland) and the sampling time, the

latter being the repeated factor. Pair-wise differences between levels of factors were assessed using a *t*-test. Bonferroni corrections were used to take into account multiple comparisons.

### ***Ecological survey: Partitioning of the biological variation for survival ratio in the 100 soils***

Forty different soil properties and environmental parameters were used in this analysis (Table S1). To identify the soil edaphic and the environmental factors driving *L. monocytogenes* survival in soils, all the explaining variables measured were first grouped into five categories: soil texture, soil chemistry, land use, climate and spatial coordinates.

Spatial vectors were constructed using the Principal Coordinates of a Neighbor Matrix approach (PCNM, (Borcard and Legendre 2002)). This method was applied to the geographic coordinates of the different sampled sites and yielded 59 spatial vectors. All quantitative explanatory variables were transformed using Box-Cox transformation prior to analyses (the corresponding lambda parameters were estimated by maximum likelihood (Cook and Weisberg 1999)).

For each  $i = 1, \dots, 11$ , significant explanatory variables, as well as PCNM vectors, were chosen by model selection (forward and backward) and by minimizing the Akaike Information Criterion (AIC). Statistical significance was assessed by 1999 permutations of the reduced model. The respective contribution of contextual variables (explanatory variables or combinations of explanatory variables) was assessed using redundancy analysis ordination (Peres-Neto *et al.* 2006). All these analyses were performed with R using the vegan package (functions *pcnm*, *varpart* and *rda*).

## **RESULTS**

### ***Identification of soil abiotic (physico-chemical) properties impacting *L. monocytogenes* survival in a panel of 100 soils***

Total cultivable bacteria were enumerated for each soil at day 0, day 7, day 14 and day 84. At day 0, total number of bacteria range from  $4.78 \times 10^6$  to  $1.07 \times 10^8$  CFU per gram of soil. We found that the total bacterial community counts remain stable (within the same order of magnitude) over the 2-month experiment period for all investigated soils (Student's *t* test,  $p=0.265$ ).

**Table III-2. Partitioning of the variation of survival ratios of *Listeria monocytogenes* as a function of contextual variables.**

		Overall model			% explained variance of the contextual variables		
		N <sup>a</sup>	F-ratio	Explained variance <sup>b</sup> (%)	Soil Chemistry	Soil Texture	Spatial Distance
Survival at	Day 7	13	30.64 <sup>***</sup>	79.5	64.5 <sup>***</sup>	2 <sup>**</sup>	0.5 <sup>°</sup>
	Day 14	5	43.02 <sup>***</sup>	67.1	65.4 <sup>***</sup>	-	1.6 <sup>°</sup>
	Day 84	8	27.64 <sup>***</sup>	46.6	1.3 <sup>NS</sup>	11.1 <sup>***</sup>	4.2 <sup>*</sup>

<sup>a</sup> N is the number of explanatory variables retained after selecting the most parsimonious explanatory variables (by minimizing the Akaike Information Criterion).

<sup>b</sup> the % explained variance corresponds to the adjusted R<sup>2</sup> values of the overall model using partial redundancy analysis.

<sup>NS</sup> Non Significant, <sup>°</sup> p < 0.1, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 and \*\*\* p < 0.001.

Note that the covariation between the contextual variables is not reported in this table, therefore summing over the different contextual variables does not give the % explained variance of the overall model.

- Soil texture do not explain any variance of the survival ratio of *L. monocytogenes* at day 14

**Table III-3. Contribution of the five most important explanatory variables to the variation in survival ratios of *Listeria monocytogenes*.**

% Variance explained by:						
<i>Survival at</i>	<i>Day 7</i>	BCSR (55.4%)	CEC (10.3%)	Coarse Silt (4.6%)	Sp. Dist <sub>V6</sub> (2.6%)	Al <sub>exch</sub> (1.8%)
	<i>Day 14</i>	BCSR (47.7%)	Ca <sub>exch</sub> (11%)	Mn <sub>exch</sub> (4.9%)	Al <sub>exch</sub> (4.6%)	Sp. Dist <sub>V13</sub> (1.1%)
	<i>Day 84</i>	Clay (30.9%)	Al <sub>exch</sub> (5.5%)	CaCO <sub>3tot</sub> (3.5%)	Sp. Dist <sub>V3</sub> (2.9%)	Temp <sub>month</sub> (2.7%)

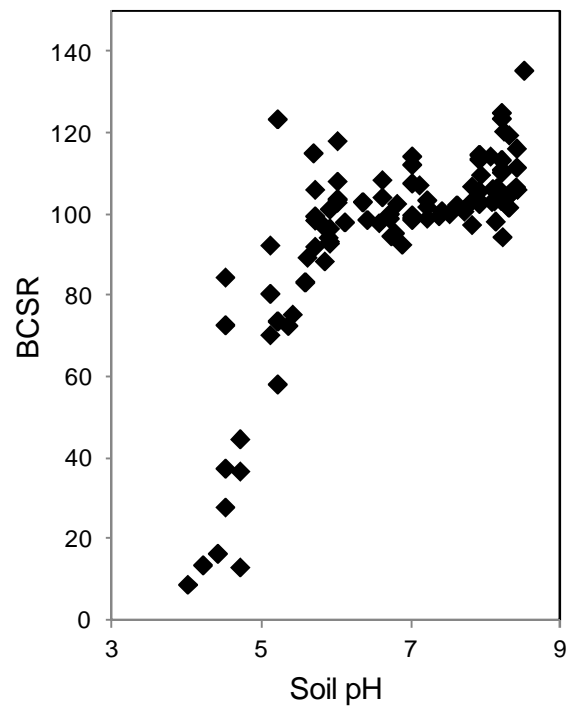
The respective contributions of each variable were calculated by taking into account all the significant variables in the model using partial redundancy analyses (significance assessed with 1999 data permutations).

BCSR : Basic Cation Saturation Ratio, CEC : Cation-Exchange Capacity, Sp. Dist<sub>V</sub> : Spatial Distance correspond to the spatial vector *x* from the PCNM analysis, Al<sub>exch</sub> : exchangeable aluminum, Ca<sub>exch</sub> : exchangeable calcium, Mn<sub>exch</sub> : exchangeable manganese, CaCO<sub>3tot</sub> : Total calcareous content, Temp<sub>month</sub> : mean temperature per month

As soils were stored for varying periods, a regression analysis between *L. monocytogenes* survival rates and soil sampling date (year) was done. This analysis revealed no correlation between these two variables (data not shown). The age of soil samples doesn't seem to influence *L. monocytogenes* survival.

Survival of *L. monocytogenes* was determined in a collection of 100 soils. *L. monocytogenes* population globally declined with time in the 100 soils. In 71% of the soils, *L. monocytogenes* was detected until the end of the experiment (i.e. 84 days after inoculation) and final populations ranged from 10 to  $1.27 \times 10^4$  CFU per gram of soil. In 21% of the soils, survival was observed only at short term (up to day 7 or up to day 14). Finally, in 8% of the soils, *L. monocytogenes* was not detected 7 days after inoculation.

To identify soil edaphic and environmental factors driving *L. monocytogenes* survival in soils, partial regression models were calculated for the 5 categories of explaining variables (Table III-2). Using this approach, we were able to explain from 46.6% to 79.5% of the survival observations. Most of the variance of the survival ratios was explained by 3 groups of variables, i.e. soil chemistry, soil texture and spatial localization. Climate and land use do not appear in the model (Table III-2) because they do not explain any variance of the survival ratios of *L. monocytogenes*. Soil chemistry was relevant to explain short-term survival ratios at days 7 and 14 (64.5% and 65.4%) of *L. monocytogenes* in soils (Table III-2). When studying the effect of each variable independently, Basic Cation Saturation Ratio (BCSR) was identified as the major soil chemical characteristic determining short-term survival profiles (day 7 and day 14, Table III-3) and differences in soil BCSR explained up to 55.4% of the variability of *L. monocytogenes* survival. Cationic exchange capacity (10.3%) in one hand and exchangeable Ca (11%) in the other hand further explained survival ratio of *L. monocytogenes* at day 7 and day 14, respectively. Soil texture was the contextual variable with the highest weight for explaining long-term survival profiles (up to day 84), as it explained 11% of the observed variance (Table III-2). When studying the effect of each variable independently, clay content explaining 30.9% of the observed variance seems to be the major contributor followed by exchangeable Al (Table III-3). Interestingly, pH was not found to be a significant contributing factor to *L. monocytogenes* survival but this is explained by the fact that BCSR and pH are strongly but non-linearly correlated as shown in supporting figure (Figure III-2). Hence, variation in survival ratio captured by the BCSR cannot be attributed to the pH in the partial regression analysis. In other terms, if the BCSR was removed from the analysis, pH would be selected as a significant explaining variable.



**Figure III-2. Relationship between pH and corresponding BCSR of the 100 non-sterile soils.**

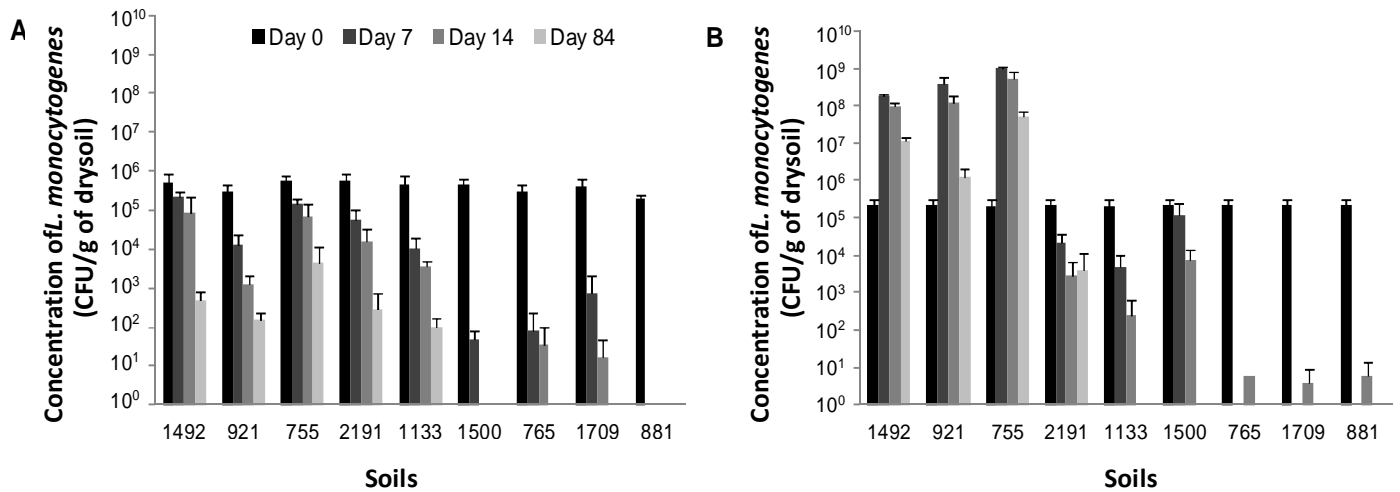


***Evaluating the impact of the interactions between biotic and abiotic soil parameters on *L. monocytogenes* survival***

Focusing on a subset of 9 soils chosen for their contrasted physico-chemical properties and land use characteristics (Table III-1), we evaluated the impact of the soil endogenous microbiota on the survival ratio of *L. monocytogenes* in a replicated complete block design. Statistical analysis by ANOVA allowed first to validate the reliability of inoculation and counting method and the repeatability between experiments. *L. monocytogenes* population globally declined with time in non-sterile soils. However, significant differences in the survival profiles were observed between the nine different soils (Figure III-3, panel A). Long-term survival was observed after inoculation in 5 soils (n° 1492, 921, 755, 2191 and 1133) and the population of *L. monocytogenes* range from about  $10^2$  to  $4 \times 10^3$  bacteria per gram of soil at the end of the experiment (84 days). In three other soils (soils n°1500, 765, and 1709) survival did not exceed 7 to 14 days after inoculation, while in soil n° 881, *L. monocytogenes* was no longer detected as soon as 7 days after inoculation. Results showed that the survival of *L. monocytogenes* was different between sterile soils (Figure III-3, panel B). Indeed, 1 to 3 log growth was observed in soil n° 1492, 921 and 755. For the others soils, no growth of *L. monocytogenes* was observed and *L. monocytogenes* abundance decreased. In these soils, both short and long-term survival profiles were observed as already noticed with-non sterile soils.

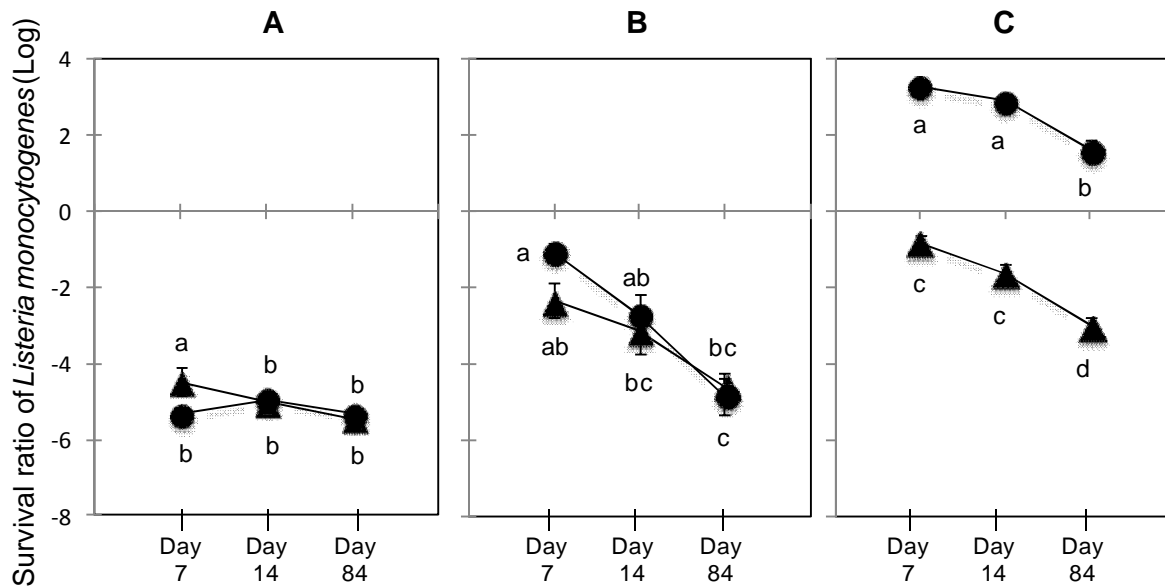
Using repeated-measures ANOVA, we investigated whether pH or land use could be factors interacting with the soil microbiological status and accounting for the different survival profiles observed over the experiment time course (Table III-4). We found a strong and significant interaction between pH and the microbiological status of the soil ( $F_{2,132} = 55.03$ ,  $p < 0.001$ ) that explains a large part of the observed variance in *L. monocytogenes* survival ratio. The 3-way interaction integrating time is also significant ( $F_{4,132} = 4.47$ ,  $p = 0.002$ ) indicating that differences in survival ratio between pH classes for the sterilized and the unsterilized soils vary over time. Globally, *L. monocytogenes* survival is higher in the highest pH class of soils, than in lower pH classes of soils. Moreover, the suppressive role of the endogenous microbiota on its survival is clearly evidenced in the high pH class and growth of *L. monocytogenes* populations was observed in sterilized soils grouped in the highest pH class (Figure III-4).

We also found a significant 3-way interaction between land use, microbiological status of the soil and time of sampling ( $F_{4,132} = 4.14$ ,  $p = 0.003$ ) on *L. monocytogenes* survival. The



**Figure III-3. Survival of *Listeria monocytogenes* in nine soils (A) non-sterile and (B) sterile.**

*L. monocytogenes* population density (CFU per gram of dry soil) measured at Days 0, 7, 14 and 84 after inoculation are presented. Error Bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation over three replicated measurements.



**Figure III-4. Mean survival ratios of *L. monocytogenes* in non-sterile and sterile soils with variable pHs.**

The nine soils were distributed in three equal classes function of their pH with (A) 3 soils with pH < 5.5, (B) 3 soils with 5.5 < pH < 7 and (C) 3 soils with pH > 7. Mean survival ratios were calculated between soils belonging to the same pH classes for each sampling time. Triangles represents mean survival ratio in non-sterile soils and circles represented mean survival ratio in sterile soils. Error bars represent the mean  $\pm$  standard deviation of triplicate experiments.

highest survival was observed in soils collected from culture fields while it is lowest in grassland (sterilized or unsterilized). However, land use classes overlapped to some extent with pH classes. For example, two out of the three culture soils belong to the high pH class and two out of the three grassland soils belong to the low pH class, the forest soils being the only well-spread out in the different pH classes. For these reasons, pH appeared to be more likely (than land use) an explaining factor determining *L. monocytogenes* survival in soils. This study based on a small subset of soils allowed us to identify the pH and the endogenous microbial communities as important factors influencing *L. monocytogenes* survival in soils.

## DISCUSSION

Circulation of pathogens in the farm environment may generate health hazards (Jones 1999; Aytac *et al.* 2010; Jeyaletchumi *et al.* 2011). Regarding food-borne pathogens, pre-harvest contamination may be a source of food contamination, thus increasing the risk of outbreaks. The presence of the food-borne pathogen *L. monocytogenes* in soil has been connected with pre-harvest food contamination (Vanrenterghem *et al.* 1991; Girardin *et al.* 2005; Jablasone *et al.* 2005) and its survival in soil has been documented (Welshimer 1960; Dowe *et al.* 1997; Nicholson *et al.* 2005; McLaughlin *et al.* 2011) but limited information is available on the soils used in these studies and edaphic factors that may affect its survival are poorly understood. Previous studies focused on a limited number of soils including from 1 to 3 soils (Welshimer 1960; Nicholson *et al.* 2005). Moreover, in these studies, soils were mainly characterized by their textural classes and only a few chemical characteristics were available and were used in statistical analysis (Dowe *et al.* 1997; Nicholson *et al.* 2005). In this study, we investigated the survival of *L. monocytogenes* in a large set of 100 well-characterized soils (chemical and textural characteristics) representative of the French territory and occurring worldwide. Indeed, the variation of the age of the soil samples is inherent to a study based on a very large set of soils. In our study, the age of soil samples did not explain any variation of the survival rates of *L. monocytogenes*. This result suggests that soil storage did not modify significantly soil composition and thus did not introduce a major bias in the experiment. Moreover, there is no significant quantitative variation of total soil bacterial populations over the 2 months experiment for all soil tested

We observed a decline of *L. monocytogenes* populations with time in all 100 soils that is consistent with previous studies (Welshimer 1960; Botzler *et al.* 1974; Dowe *et al.* 1997; McLaughlin *et al.* 2011). Moreover, in the present study, we demonstrated that the survival

**Table III-4. Analysis of variance for *Listeria monocytogenes* survival ratios in a subset of nine soils.**

<i>Sources of Variation</i>	<i>df</i>	<b>Survival Ratio</b>	
		<i>Sum of Squares</i>	<i>F</i>
<i>pH</i>	2	608.15	471.88***
<i>Microbiological status</i> <sup>a</sup>	1	99.20	153.94***
<i>Land use</i>	2	21.16	16.42***
<i>Day of sampling</i>	2	90.77	70.44***
<i>Land use*Microbiological status</i>	2	13.31	10.33***
<i>Land use*Day of sampling</i>	4	1.85	0.72
<i>pH*Microbiological status</i>	2	70.92	55.03***
<i>pH*Day of sampling</i>	4	25.77	9.99***
<i>Microbiological status*Day of sampling</i>	2	0.27	0.21
<i>Land use*Microbiological status*Day of sampling</i>	4	10.68	4.14**
<i>pH*Microbiological status*Day of sampling</i>	4	11.53	4.47**

df: degrees of freedom, F: Fisher's F,

<sup>a</sup> : correspond to sterilized versus non-sterilized soils

\*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01

ratio depended on the soil under scrutiny and overall three trends were evidenced: long-term, short-term and lack of survival. Indeed, in most soils (71%), *L. monocytogenes* was still detected at the end of the experiment (84 days); this long-term survival is in agreement with previous studies relating *L. monocytogenes* survival until 200 days in a clay soil and 295 days in a òfertileö (as stated by authors) soil (Welshimer 1960; Botzler *et al.* 1974; Dowe *et al.* 1997; McLaughlin *et al.* 2011). In 21% of soils, the pathogen was no longer detected after two weeks. Finally, in 8% of soils, a dramatic decline to undetectable levels occurred within the first week of incubation. A similar observation was reported in a forest soil by McLaughlin *et al.* (McLaughlin *et al.* 2011). Identification of edaphic factors that may explain these trends is difficult as biotic and abiotic parameters are intertwined, however our study demonstrated clearly and for the first time that *L. monocytogenes* is able to survive in a majority of soils.

We used intentionally large numbers of bacteria for the inoculation of soil samples to facilitate short term monitoring of declining populations. This might introduce a bias since the survival of larger bacterial population requires higher quantities of nutrients. However, Dowe *et al.* (1997), using two levels of inoculum ( $10^2$  and  $10^6$  bacteria per gram of soil) have demonstrated that after a short period, *L. monocytogenes* counts reached similar levels with both inocula (Dowe *et al.* 1997). This result indicates that *L. monocytogenes* survival in soil is not durably affected by the size of the inoculum.

The statistical model we developed could explain most of the variance of *L. monocytogenes* short term survival (67% at day 14 and 80% at day 7) suggesting that the comprehensive characterization of our soil samples is adequate to explain short-term survival ratio. The soil chemistry was the most significant contextual variable and, among these variables, the Base Cation Saturation Ratio (BCSR) was the most impacting on short-term survival. BCSR was calculated as a ratio between the sum of exchangeable base cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$ ) and CEC. The CEC of a soil is the total quantity of exchangeable cations that a soil can fix and release at a specific pH.

Contrarily to short-term survival, the model was less efficient in explaining variations of long-term survival (47% at day 84) this suggests that the soil abiotic characteristics that fed the model were not sufficient to explain long-term survival. We can hypothesize that soil microflora is one of the variables missing and that biotic factors are critical for long term survival. However, soil texture and more precisely clay content appear to be the principal

variables explaining long-term survival variance among the abiotic factors analyzed (Figure III-1).

Until now, only a few studies have shown that soil texture had an impact on *L. monocytogenes* survival (Welshimer 1960; Dowe *et al.* 1997; Nicholson *et al.* 2005). The survival of other pathogens such as *E. coli* or *Salmonella* spp. was also shown to depend on the soil texture (Fenlon *et al.* 2000; Mubiru *et al.* 2000; Nicholson *et al.* 2005; Franz *et al.* 2008). In general, these studies demonstrated that finer-textured (clayey) soils result in prolonged survival of introduced bacterial pathogens compared to coarser-textured (sandy) soil.

The experiment conducted on a subset of 9 soils (comparison of sterile versus non sterile soil) evidenced the major role of soil microflora in controlling *L. monocytogenes* survival. Our results are in agreement and reinforce previous studies (Botzler *et al.* 1974; Dowe *et al.* 1997; McLaughlin *et al.* 2011) showing that suppression of the microflora allowed the growth of *L. monocytogenes* in soils. Unexpectedly, no *L. monocytogenes* growth was observed in sterilized microcosms for 6 out of the 9 soils tested in our study. This result strongly suggests that abiotic characteristics of these soils were non-permissive for the growth (and survival) of *L. monocytogenes*. The repeated-measures ANOVA pointed out to pH as the major factor explaining this lack of growth. Indeed, we found a strong and significant interaction between pH and soil microflora on *L. monocytogenes* survival. More precisely, the suppressive effect of soil microflora on *L. monocytogenes* survival was the strongest in soils with high pHs. Soil pH has already been identified as a structuring and even predictive parameter for the composition and structure of global bacterial communities (Hartman *et al.* 2008; Lauber *et al.* 2009). Bacterial richness and diversity appears to be higher in neutral soils and lower in acidic soils (Fierer and Jackson 2006; Hartman *et al.* 2008). Similarly, pH seems to be critical for the fate of *L. monocytogenes* in soil, since the survival ratio is higher in neutral soils.

In our study, we demonstrate that chemical properties of soils (in particular BCSR) explain most of the variability of short-term survival (soil texture explaining mostly long-term survival). However, it is established that soil chemistry is tightly linked to soil texture. The BCSR reflects the amount of base cations present in soil as well as the number of negative sites supplied by the soil matrix. Clay particles and organic matter are both constituents of soil that harbor negative charges which can fix and release positively charged nutrients including

cations. So, clay and organic matter content largely determine the CEC and the BCSR of a soil. Most of the studies investigating the effect of soil texture on bacterial pathogens survival highlight the fact that finer-textured soils with high clay content are more favorable to bacterial pathogens survival than coarser-textured soils. This trend can be explained by a higher availability of pore spaces protecting bacteria from protozoan predation. Our result further complete this explanation proving that the finer soil texture with high clay content will also help to maintain a sufficient base cations pool essential for bacterial life. This hypothesis can be confirmed by the result of the long-term survival, which is correlated with clay content.

Only plate counts were used to monitor *L. monocytogenes* survival. This might lead to underestimate *L. monocytogenes* concentration if Viable But Not Culturable (VBNC) cells of *L. monocytogenes* are present (Besnard *et al.* 2000; Lindbäck *et al.* 2010). Indeed, VBNC state can be induced for *L. monocytogenes* in response to low pH and nutrient limitation (Besnard *et al.* 2002; Cunningham *et al.* 2009; Lindbäck *et al.* 2010). These conditions (low pH and starvation) may occur in some soil microcosms. Occurrence of VBNC *L. monocytogenes* may induce inconsistencies of the model to explain variations of *L. monocytogenes* survival (especially for survival at 84 days). Counting VBNC bacteria in non sterile soil samples is extremely difficult, however, this could be achieved

Overall, this is the first extensive study of the survival of *L. monocytogenes* in a large collection of well characterized soils. We found that the pool of cations that soil can exchange is an indicator of *L. monocytogenes* short-term survival, that population decline is faster in acidic soils and finally that the presence of the microflora participates to the barrier effect of soil towards invasion by *Listeria monocytogenes*. Further work should aim at deciphering which members of the soil microflora are critical to explain *L. monocytogenes* survival. This might be realized on a limited subset of soils chosen for contrasted characteristics.

## ACKNOWLEDGMENTS

Aude Locatelli was funded by the French Agency for Environment and Energy Management (ADEME) and INRA (Environnement Agronomie Department). Part of this work was funded by the Conseil Régional de Bourgogne. This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) (programs 07 SEST project 018-01, 05 SEST project 009-01). The RMQS

network is supported by a French Scientific Group of Interest on soils: the ŒGIS SolŒ, involving the French Ministries in charge of Ecology and Agriculture, ADEME, INRA, the Institute for Research and Development (IRD) and the National Institute for Geographic and Forest Information (IGN). We thank all the soil surveyors and technical assistants involved in sampling the sites. Special thanks are addressed to the technical assistants from the National French Soil Bank for sample handling and preparation.

## BIBLIOGRAPHY

**Al-Ghazali, M. R. & Al-Azawi, S. K. (1990).** *Listeria monocytogenes* contamination of crops grown on soil treated with sewage sludge cake. *Journal of Applied Bacteriology* **69**, 642-647.

**Aureli, P., Fiorucci, G. C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L. & Salmaso, S. (2000).** An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *New England Journal of Medicine* **342**, 1236-1241.

**Aytac, S. A., Ben, U., Cengiz, C. & Taban, B. M. (2010).** Evaluation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination on leafy green vegetables. *J Food Agric Environ* **8**, 275-279.

**Besnard, V., Federighi, M. & Cappelier, J. M. (2000).** Development of a direct viable count procedure for the investigation of VNBC state in *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* **31**, 77-81.

**Besnard, V., Federighi, M., Declercq, E., Jugiau, F. & Cappelier, J.-M. (2002).** Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Veterinary research* **33**, 359-370.

**Beuchat, L. R. (1996).** *Listeria monocytogenes*: Incidence on vegetables. *Food Control* **7**, 223-228.

**Borcard, D. & Legendre, P. (2002).** All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices. *Ecological Modelling* **153**, 51-68.

**Borucki, M. K., Gay, C. C., Reynolds, J., McElwain, K. L., Kim, S. H., Call, D. R. & Knowles, D. P. (2005).** Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* strains from a high-prevalence dairy farm. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 5893-5899.

**Botzler, R. G., Cowan, A. B. & Wetzler, T. F. (1974).** Survival of *Listeria monocytogenes* in soil and water. *Journal of Wildlife Diseases* **10**, 204-212.

**Colburn, K. G., Kaysner, C. A., Abeyta, C. & Wekell, M. M. (1990).** *Listeria* species in a California coast estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 2007-2011.

**Cook, R. & Weisberg, S. (1999).** *Applied Regression, Including Computing and Graphics*: Wiley-Interscience.

**Cunningham, E., O'Byrne, C. & Oliver, J. D. (2009).** Effect of weak acids on *Listeria monocytogenes* survival: Evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH. *Food control* **20**, 1141-1144.



**Dowe, M. J., Jackson, E. D., Mori, J. G. & Bell, C. R. (1997).** *Listeria monocytogenes* survival in soil and incidence in agricultural soils. *Journal of Food Protection* **60**, 1201-1207.

**El Marrakchi, A., Boum'handi, N. & Hamama, A. (2005).** Performance of a new chromogenic plating medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from marine environments. *Letters in Applied Microbiology* **40**, 87-91.

**Farber, J. M. & Peterkin, P. I. (1991).** *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* **55**, 476-511.

**Fenlon, D. R., Ogden, I. D., Vinten, A. & Svoboda, I. (2000).** The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 149S-156S.

**Fierer, N. & Jackson, R. B. (2006).** The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 626-631.

**Franz, E., Semenov, A. V., Termorshuizen, A. J., de Vos, O. J., Bokhorst, J. G. & van Bruggen, A. H. C. (2008).** Manure-amended soil characteristics affecting the survival of *E. coli* O157 : H7 in 36 Dutch soils. *Environmental Microbiology* **10**, 313-327.

**Gaul, L. K., Farag, N. H., Shim, T., Kingsley, M. A., Silk, B. J. & Hyytia-Trees, E. (2013).** Hospital-acquired Listeriosis outbreak caused by contaminated diced celery - Texas, 2010. *Clinical Infectious Diseases* **56**, 20-26.

**Girardin, H., Morris, C. E., Albagnac, C., Dreux, N., Glaux, C. & Nguyen-The, C. (2005).** Behaviour of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments. *FEMS Microbiology Ecology* **54**, 287-295.

**Gray, M. L., A. H. Killinger (1966).** *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *BacteriologyReviews* **30**, 309-382.

**Grif, K., Patscheider, G., Dierich, M. P. & Allerberger, F. (2003).** Incidence of fecal carriage of *Listeria monocytogenes* in three healthy volunteers: A one-year prospective stool survey. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **22**, 16-20.

**Grolleau, E., L. Bargeot, A. Chafchafi, R. Hardy, J. Doux, A. Beaudou, H. Le Martret, J. C. Lacassin, J. L. Fort, P. Falipou and D. Arrouays (2004).** Le système d'information national sur les sols : DONESOL et les outils associés. *Étude et Gestion des Sols* **11**, 255-269.

**Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S. & Loessner, M. J. (2009).** Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied and environmental microbiology* **75**, 93-100.

**Hartman, W. H., Richardson, C. J., Vilgalys, R. & Bruland, G. L. (2008).** Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 17842-17847.

**Hutchison, M. L., Walters, L. D., Avery, S. M., Munro, F. & Moore, A. (2005).** Analyses of livestock production, waste storage, and pathogen levels and prevalences in farm manures. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 1231-1236.

**ISO10381-1 (2002).** Soil quality - Sampling - Part 1: Guidance on the design of sampling programmes

**Jablasone, J., Warriner, K. & Griffiths, M. (2005).** Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. *International Journal of Food Microbiology* **99**, 7-18.

**Jacquet, C., Catimel, B., Brosch, R., Buchrieser, C., Dehaumont, P., Goulet, V., Lepoutre, A., Veit, P. & Rocourt, J. (1995).** Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2242-2246.

**Jeyaletchumi, P., Tunung, R., Selina, P. M., Chai, L. C., Radu, S., Farinazleen, M. G., Cheah, Y. K., Mitsuki, N., Yoshitsugu, N. & Kumar, M. P. (2011).** Evaluation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in selected vegetable farms. *J Trop Agric and Fd Sc* **39**, 255-266.

**Jolivet, C., D. Arrouays, L. Boulonne, C. Ratié and S. Saby (2006).** Le Réseau de mesures de la qualité des sols de France (RMQS) Etat d'avancement et premiers résultats. *étude et Gestion des Sols* **13**, 149-164.

**Jones, D. L. (1999).** Potential health risks associated with the persistence of *Escherichia coli* O157 in agricultural environments. *Soil Use and Management* **15**, 76-83.

**Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R. & Fierer, N. (2009).** Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 5111-5120.

**Lemunier, M., Francou, C., Rousseaux, S., Houot, S., Dantigny, C., Piveteau, P. & Guzzo, J. (2005).** Long-term survival of pathogenic and sanitation indicator bacteria in experimental biowaste composts. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 5779-5786.

**Lindbäck, T., Rottenberg, M. E., Roche, S. M. & Rorvik, L. M. (2010).** The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Veterinary research* **41**, 1-10.

**Low, J. C. & Donachie, W. (1997).** A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J* **153**, 9 - 29.

**Lyautey, E., Lapen, D. R., Wilkes, G., McCleary, K., Pagotto, F., Tyler, K., Hartmann, A., Piveteau, P., Rieu, A. I., Robertson, W. J., Medeiros, D. T., Edge, T. A., Gannon, V. & Topp, E. (2007).** Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the south nation river watershed, Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 5401-5410.

**McLaughlin, H., Casey, P., Cotter, J., Gahan, C. & Hill, C. (2011).** Factors affecting survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in soil samples. *Archives of Microbiology* **193**, 775-785.

**Mead, P. S., Dunne, E. F., Graves, L., Wiedmann, M., Patrick, M., Hunter, S., Salehi, E., Mostashari, F., Craig, A., Mshar, P., Bannerman, T., Sauders, B. D., Hayes, P., Dewitt, W., Sparling, P., Griffin, P., Morse, D., Slutsker, L. & Swaminathan, B. (2006).** Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiology and Infection* **134**, 744-751.

**Mubiru, D. N., Coyne, M. S. & Grove, J. H. (2000).** Mortality of *Escherichia coli* O157 : H7 in two soils with different physical and chemical properties. *Journal of Environmental Quality* **29**, 1821-1825.

**NF ISO 10381-6 (2009).** Soil quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory.

**Nicholson, F. A., Groves, S. J. & Chambers, B. J. (2005).** Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology* **96**, 135-143.

**Nightingale, K. K., Schukken, Y. H., Nightingale, C. R., Fortes, E. D., Ho, A. J., Her, Z., Grohn, Y. T., McDonough, P. L. & Wiedmann, M. (2004).** Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 4458-4467.

**Peres-Neto, P. R., Legendre, P., Dray, S. p. & Borcard, D. (2006).** Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology* **87**, 2614-2625.

**Ranjard, L., Dequiedt, S., Jolivet, C., Saby, N. P. A., Thioulouse, J., Harmand, J., Loisel, P., Rapaport, A., Fall, S., Simonet, P., Joffre, R., Boure, N. C. P., Maron, P. A., Mougél, C., Martin, M. P., Toutain, B., Arrouays, D. & Lemanceau, P. (2009).** Biogeography of soil microbial communities: a review and a description of the ongoing french national initiative. *Agronomy for Sustainable Development* **30**, 359-365.

**Ranjard, L., Dequiedt, S., Prévost-Bouré, N. C., Thioulouse, J., Saby, N. P. A., Lelievre, M., Maron, P. A., Morin, F. E. R., Bispo, A. & Jolivet, C. (2013).** Turnover of soil bacterial diversity driven by wide-scale environmental heterogeneity. *Nature communications* **4**, 1434.

**Rocourt, J., Jacquet, C. & Reilly, A. (2000).** Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology* **62**, 197-209.

**Siegman-Igra, Y., Levin, R., Weinberger, M., Golan, Y., Schwartz, D., Samra, Z., Konigsberger, H., Yinnon, A., Rahav, G. & Keller, N. (2002).** *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide. *Emerging infectious diseases* **8**, 305.

**Sim, J., Hood, D., Finnie, L., Wilson, M., Graham, C., Brett, M. & Hudson, J. A. (2002).** Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. *Letters in applied microbiology* **35**, 409-413.

**Slutsker, I. & Schuchat, A. (1999).** Listeriosis in Humans. In *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, pp. 75-95. Edited by E. Ryser & E. Marth. New York: Dekker Marcel.

**Vanrenterghem, B., Huysman, F., Rygole, R. & Verstraete, W. (1991).** Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. *Journal of Applied Bacteriology* **71**, 211-217.

**Weis, J. & Seeliger, H. P. R. (1975).** Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Applied Microbiology* **30**, 29-32.

**Welshimer, H. J. (1960).** Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *Journal of Bacteriology* **80**, 316-320.

**Welshimer, H. J. (1968).** Isolation of *Listeria monocytogenes* from Vegetation. *Journal of Bacteriology* **95**, 300-303.

**Welshimer, H. J. (1975).** *Listeria* in nature. *Problems of listeriosis*, 59-60.

**Wesley, I. (1999).** Listeriosis in animals. In *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, pp. 39-73. Edited by E. Ryser & E. Marth. New York: Dekker Marcel.

**Wing, E. J. & Gregory, S. H. (2002).** *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *Journal of Infectious Diseases* **185**, S18-S24.

## Article 4 ó Etude de la survie d'*E. faecalis* en fonction des paramètres biotiques et abiotiques des sols ó Comparaison avec *L. monocytogenes*

---

### 1. Introduction

*Enterococcus faecalis* est une bactérie en forme de coque à Gram positif, anaérobie facultative, catalase-négative, non sporulée. C'est un hôte commensal de la microflore intestinale de l'être humain et des animaux à sang chaud (Noble 1978; Leclerc *et al.* 1996; Franz *et al.* 1999). Il est considéré comme un indicateur de contamination et est recherché lors de contrôles microbiologiques pour évaluer la qualité de l'eau de baignade ou l'eau de boisson (Wheeler *et al.* 2002; USEPA 2004). En addition, *E. faecalis* peut également se comporter comme un pathogène opportuniste, principalement en milieux hospitaliers (Edmond *et al.* 1999). Il est responsable d'infections variées telles que des endocardites, des bactériémies, des méningites, des infections urinaires, et des infections intra-abdominales (Chenoweth and Schaberg 1990; Jett *et al.* 1994). *E. faecalis* est ubiquiste dans l'environnement et peut être isolé de cours d'eau (Mondragon *et al.* 2011; Castillo-Rojas *et al.* 2013), de sédiments (Badgley *et al.* 2010), de végétation (Micallef *et al.* 2012; Valenzuela *et al.* 2012) et dans le sol (Fujioka *et al.* 1998; Byappanahalli *et al.* 2012b).

Le choix d'un deuxième modèle de bactérie à Gram positif pour analyser l'impact des paramètres physicochimiques sur la survie bactérienne est lié à un objectif de généralisation des résultats obtenus avec le modèle *L. monocytogenes*. La comparaison des paramètres impliqués dans la survie d'une bactérie commensale du tube digestif (*E. faecalis*) et d'une bactérie pathogène alimentaire ubiquiste (*L. monocytogenes*) devrait permettre de savoir si des lois générales peuvent permettre de décrire la survie de bactéries dans des environnements aussi complexes que les sols.

Le but de notre étude est (i) d'étudier la survie d'*E. faecalis* dans un échantillonnage de 100 sols français présentant des propriétés physico-chimiques et des modes d'usage contrastés, (ii) de corrélérer la survie d'*E. faecalis* avec les propriétés des sols et (iii) de comparer le comportement d'*E. faecalis* avec *L. monocytogenes* dans les sols.

## 2. Matériels et méthodes

Les méthodes employées dans cette partie sont identiques à celles décrites dans la partie III, article 3 (Locatelli *et al.* 2013b). Pour limiter la redondance au niveau de la présentation des méthodes, seules les points différents seront détaillés.

### 2.1. Echantillons de sols

Les échantillons de sols employés dans cette étude sont les mêmes que ceux décrits dans la partie III, article 3 (Locatelli *et al.* 2013b). Deux types d'échantillons de sols ont été utilisés dans ces études :

- 100 sols ont été choisis de façon aléatoire parmi la collection de sol du RMQS (Jolivet 2006; Ranjard *et al.* 2009)
- Un sous-ensemble de 9 sols (sélectionnés parmi les 100 sols) a été choisi en fonction de leurs paramètres physico-chimiques et modes d'usage contrastés pour étudier l'effet de la microflore du sol sur la survie d'*E. faecalis*. Ces sols ont été stérilisés par rayons gamma comme décrits précédemment.

### 2.2. Sélection d'un mutant d'*E. faecalis* résistant à la rifampicine

La souche type d'*E. faecalis* 20478<sup>T</sup> utilisée dans cette étude provient de la collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Allemagne). Afin de sélectionner des mutants spontanés, cette souche est cultivée sur gélose BEA (Bile esculine Azide, AES Chemunex, Bruz, France) supplémentée de 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> de rifampicine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et incubée 48h à 37°C. La vitesse spécifique de croissance de douze mutants rifampicine-résistants (Rif<sup>R</sup>) et de la souche parentale *E. faecalis* 20478<sup>T</sup> a été déterminée en milieux TSB (Tryptic Soy Broth, AES Chemunex, Bruz, France) à 20°C et 37°C. Le mutant présentant une vitesse de croissance identique à la souche parentale (à 20°C et 37°C) et une mutation stable dans le temps a été sélectionné pour la suite de l'étude.

### 2.3. Démarche expérimentale

La survie d'*E. faecalis* a été suivie sur 84 jours avec 4 temps de prélèvement : 1h après inoculation puis 7 jours, 14 jours et 84 jours après inoculation. Pour chaque sol des microcosmes individuels ont été préparés pour être sacrifiés aux 4 temps de prélèvement.

Pour chacun des 100 sols, une répétition de mesure a été réalisée pour les 4 temps de prélèvement. Pour le sous-ensemble de 9 sols non-stériles et stériles, 3 répétitions ont été réalisées pour les 4 temps de prélèvement. Des microcosmes de sols stériles non inoculés ont été réalisés comme témoins pour chacun des 9 sols afin de s'assurer que les microcosmes inoculés soient restés stériles le temps de l'expérience.

## 2.4. Préparation et inoculation des microcosmes de sols

Les microcosmes sont constitués de 2 grammes de sol sec conditionnés en pots stériles de 40 ml. Les microcosmes de sols ont été humidifiés une semaine avant l'inoculation afin d'obtenir une humidité relative correspondant à 80% de la capacité au champ. L'inoculation a été réalisée à l'aide de 120 µl de suspension cellulaire afin d'obtenir une concentration bactérienne de  $1 \times 10^6$  *E. faecalis* Rif<sup>R</sup> par gramme de sol sec. Les microcosmes ont alors été incubés à 20°C et sacrifiés à 1h (t0), 7, 14, et 84 jours après l'inoculation afin d'être analysés.

## 2.5. Suivre de la survie d'*E. faecalis*

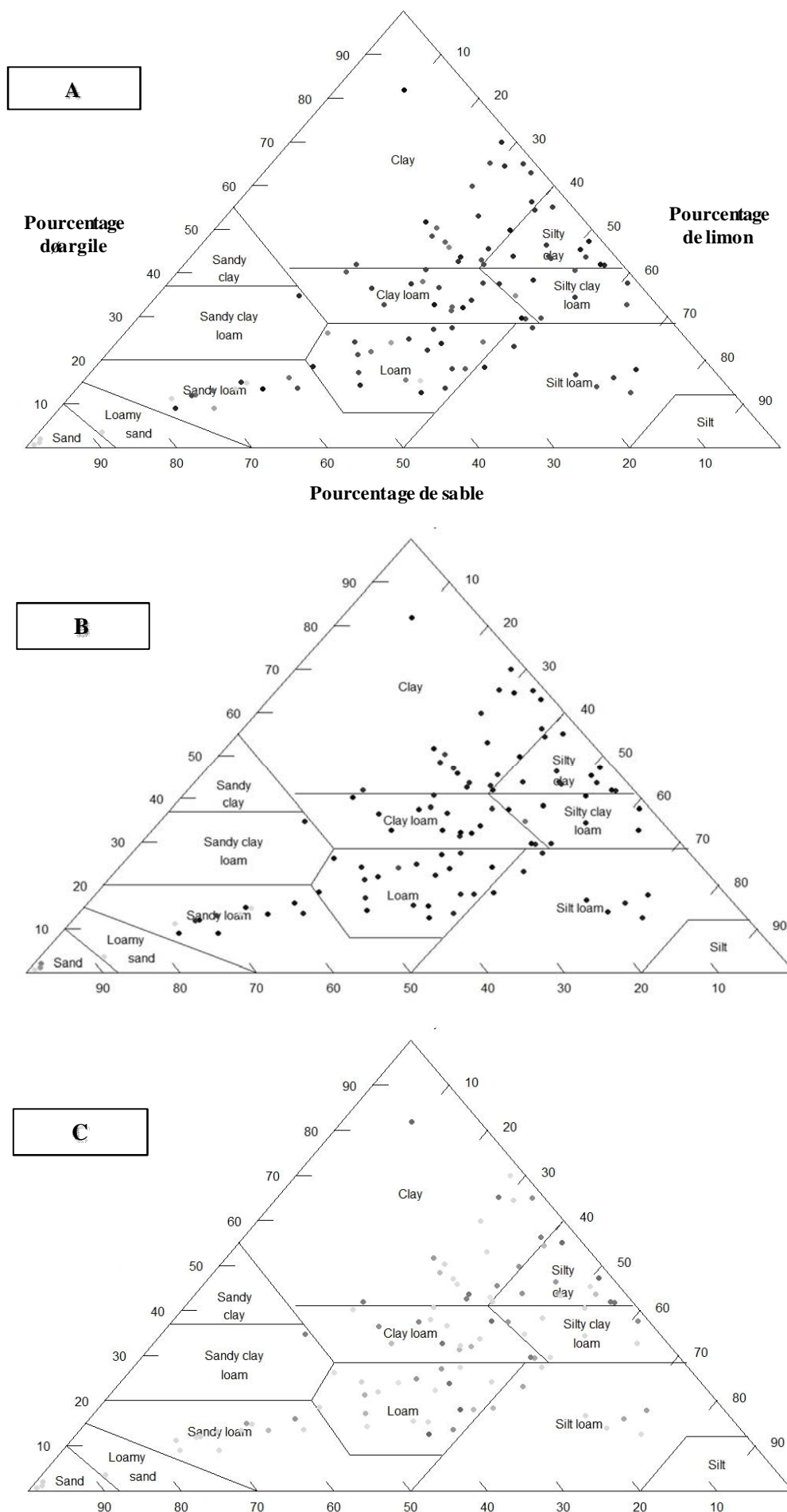
A chaque temps d'analyse, un microcosme a été sacrifié pour chaque sol. Un volume de 18 ml de TS (Tryptone Sel, 1 g.L<sup>-1</sup> tryptone, 8,5 g.L<sup>-1</sup> NaCl) a été ajouté aux microcosmes sacrifiés. Les bactéries ont été resuspendues en mélangeant pendant 10 min, à 150 rpm. Ces suspensions ont été diluées en séries et les dilutions adéquates ont été étalées sur du milieu BEA (AES Chemunex, Bruz, France) supplémenté en rifampicine (100 mg.L<sup>-1</sup>) et en cycloheximide (100 mg.L<sup>-1</sup>). Quand des hautes densités d'*E. faecalis* étaient attendues, 10 gouttes de 10 µl de chaque dilution ont été étalées sur gélose BEA (limite de détection : 100 UFC.g<sup>-1</sup> de sol sec). A l'inverse, quand moins de 100 UFC.g<sup>-1</sup> étaient attendues, 1 ml de la solution de sol non diluée a été inoculée en masse dans la gélose BEA. Les milieux ont été incubés 48h à 37°C.

## 2.6. Analyses statistiques

Après avoir vérifié que les résultats des dénombrements suivaient une distribution gaussienne, les ratios de survie ont été calculés selon la formule suivante :

$$11_{11} = 111_{11} \frac{111_{11}}{111_{11}}$$

Où  $11_{11}$  est le ratio de survie au temps tx (x = 7, 14 et 84 jours),  $111_{11}$  est le nombre d'UFC.g<sup>-1</sup> de sol sec au temps tx et  $111_{11}$  est le nombre d'UFC.g<sup>-1</sup> de sol sec au temps t0.



**Figure III-5. Distribution des 100 sols utilisés dans le triangle des textures.**

Les taux de survie d'*E. faecalis* obtenus pour chacun des 100 sols à 7 jours (A), 14 jours (B) et 84 jours (C) sont colorisés avec une échelle de gris, en gris clair les taux de survie les plus faibles et en noir les plus élevés.

Les mêmes types d'analyses statistiques que pour la partie III article 3 ont été réalisés (Locatelli *et al.* 2013b). Une ANOVA à mesures répétées a été réalisée sur les taux de survie obtenus pour le sous-ensemble de 9 sols non-stériles et stériles. Les taux de survie obtenus à partir des 100 sols ont été corrélés aux paramètres physico-chimiques, climatique et au mode d'usage des sols par partition de variance.

### 3. Résultats

#### 3.1. Identification des paramètres physico-chimiques déterminant la survie d'*E. faecalis* dans un échantillonnage de 100 sols

La survie d'*E. faecalis* a été déterminée pendant 84 jours à 20°C dans une collection de 100 sols. Dans tous les sols, la population d'*E. faecalis* décline au cours du temps. Les taux de survie d'*E. faecalis* diffèrent entre les sols. *E. faecalis* présente une survie à long-terme, c'est-à-dire plus de 84 jours, dans 49% des sols. La concentration maximale retrouvée à 84 jours est de  $8,2 \times 10^2$  *E. faecalis* par gramme de sol. Dans 46% des sols, *E. faecalis* persiste à court terme, jusqu'à 7 et 14 jours. *E. faecalis* ne survit pas plus de 7 jours dans 5% des sols.

Dans un premier temps, l'impact de la texture des sols sur la survie d'*E. faecalis* a été examiné au sein de l'échantillon de 100 sols. Dès 7 jours, la survie d'*E. faecalis* est influencée par la texture du sol. Les taux de survie les plus faibles sont associés avec les sols sableux, limono-sableux et sablo-limoneux (Figure III-5A). A l'inverse, les sols présentant une texture fine (riches en argile et en limon fin) sont plus favorables à la survie d'*E. faecalis*. Cette tendance est également observée à 14 jours de survie (Figure III-5B) mais s'estompe à 84 jours car globalement, tous les sols présentent de faibles taux de survie pour *E. faecalis* (Figure III-5C).

Dans un deuxième temps, une analyse plus globale a été réalisée. Un modèle de régression a été conçu et utilisé afin d'affiner la relation entre le taux de survie d'*E. faecalis* à 7, 14 et 84 jours et les paramètres physiques, chimiques, climatiques et le mode d'occupation caractérisant les 100 sols (Tableau III-5). Dans le modèle de régression prenant en compte toutes les variables concernant les sols, ce sont essentiellement les paramètres chimiques qui expliquent la variance du taux de survie d'*E. faecalis*. Les données sur le mode d'occupation des sols et les conditions climatiques ne participent pas à l'explication de la variance du taux de survie d'*E. faecalis*. Toutes les variables apparaissant dans le tableau sont corrélées négativement à la survie d'*E. faecalis* à l'exception du fer libre et du chrome extractible. La



**Tableau III-5: Contribution des variables explicatives dans la variation du taux de survie de *E. faecalis*.**

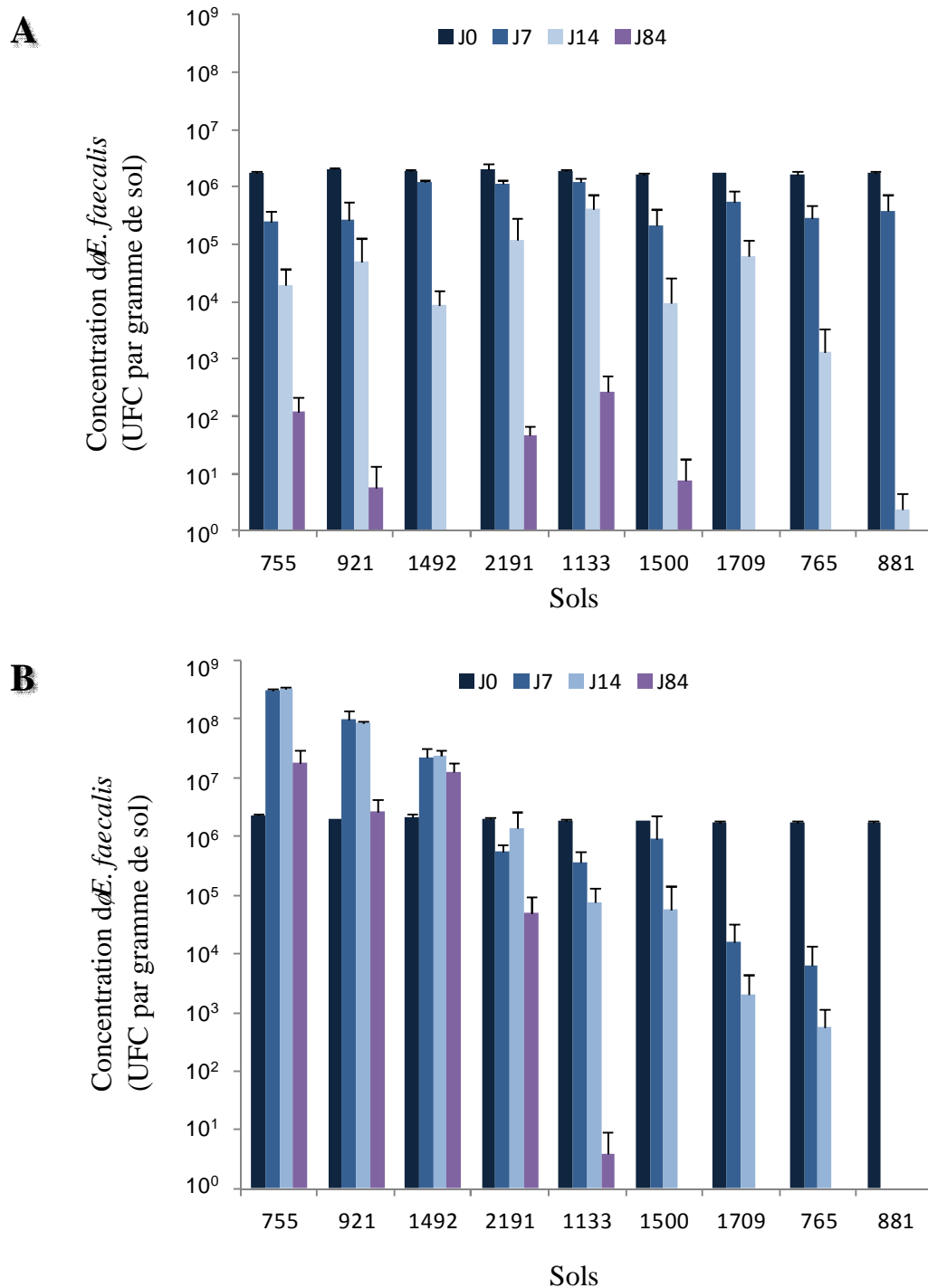
Taux de survie à	F-ratio	Variance expliquée <sup>a</sup> (%)	Principales variables explicatives de la variance				
7 jours	9,88**	41,0	Ca <sub>tot</sub> (18,8%)	Dist Sp <sub>v18</sub> (6,1%)	Dist Sp <sub>v1</sub> (5,8%)	P <sub>ass</sub> (5,6%)	Cr <sub>ext</sub> (3,9%)
14 jours	12,45**	36,6	Ca <sub>tot</sub> (15,6)	P <sub>ass</sub> (10,4%)	Sable (6,8%)	Cu <sub>ext</sub> (3,7%)	
84 jours	5,52**	19,7	P <sub>ass</sub> (10%)	Fe <sub>lib</sub> (9,6%)			

\*\*  $p < 0,01$

Ca<sub>tot</sub> : Calcium total, P<sub>ass</sub> : Phosphore assimilable, Cr<sub>ext</sub> : chrome extractible, Cu<sub>ext</sub> : cuivre extractible, Fe<sub>lib</sub> : fer libre, Dist Sp : Distance Spatiale correspondant au vecteur spatial  $x$  dans l'analyse PCNM.

<sup>a</sup> : le pourcentage de variance expliquée correspond aux valeurs ajustées du  $R^2$  du modèle global par une analyse de redondance partielle

La contribution respective de chaque variable a été calculée en prenant en compte l'ensemble des variables significatives par une analyse de redondance partielle (significativité testée par 1999 permutations des données).



**Figure III-6. Survie d'*E. faecalis* dans 9 sols (A) non-stériles et (B) stériles.**

Concentration d'*E. faecalis* (UFC par gramme de sol) au jour 0 (■), jour 7 (■), jour 14 (■) et jour 84 (■). Les barres d'écart type indiquent la variabilité des résultats entre les 3 répétitions.

**Tableau III-6 : Analyse de la variance des taux de survie de *E. faecalis* et de *L. monocytogenes* dans 9 sols en fonction du pH, du mode d'occupation et de la microflore des sols.**

	DL	SCE	F
Organisme <sup>a</sup>	1	0,2	0,30
Type <sup>c</sup>	2	262,1	162,76***
pH	2	924,2	574,00***
Statut microbiologique <sup>b</sup>	1	139,2	172,91***
Jour prélèvement	2	412,0	255,89***
Organisme*Type	2	35,2	21,89***
Organisme* Statut microbiologique	1	4,7	5,81*
Type* Statut microbiologique	2	194,3	120,66***
Organisme*Jour prélèvement	2	48,4	30,03***
Type*Jour prélèvement	4	5,9	1,82
Statut microbiologique*Jour prélèvement	2	18,7	11,62***
Organisme*pH	2	30,5	18,94***
pH* Statut microbiologique	2	194,9	121,07***
pH*Jour prélèvement	4	34,5	10,73***
Organisme*Type*Statut microbiologique	2	1,7	1,08
Organisme*Type*Jour prélèvement	4	2,9	0,90
Organisme* Statut microbiologique*Jour prélèvement	2	21,8	13,57***
Type* Statut microbiologique*Jour prélèvement	4	2,4	0,75
Organisme*pH* Statut microbiologique	2	10,7	6,67**
Organisme*pH*Jour prélèvement	4	14,7	4,57**
pH* Statut microbiologique*Jour prélèvement	4	30,0	9,33***
Organisme*Type* Statut microbiologique *Jour prélèvement	4	6,3	1,96
Organisme*pH* Statut microbiologique *Jour prélèvement	4	2,1	0,64
Résidus	259	208,5	

DL : degrés de liberté, SCE : Somme des carrés des écarts, F : Fisher's F

\*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,1$

<sup>a</sup> correspond à *E. faecalis* et *L. monocytogenes*

<sup>b</sup> correspond aux sols stérilisés et non-stérilisés

<sup>c</sup> correspond au mode d'occupation du sol

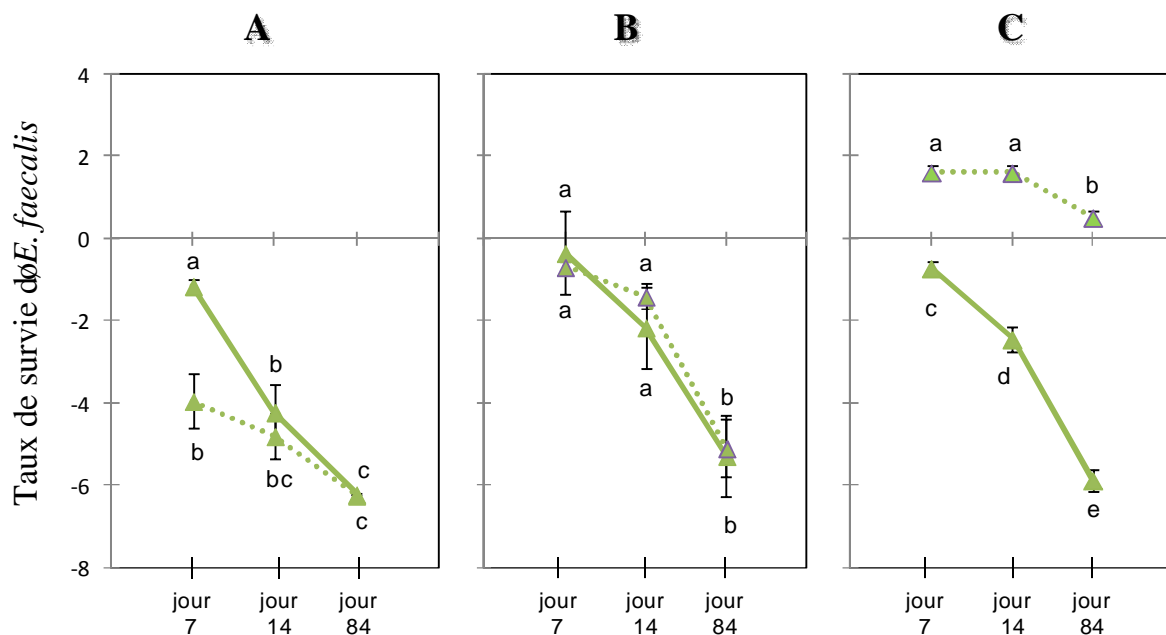
variation du temps de survie à 7 jours est expliquée à 41% par le modèle. Le paramètre contribuant le plus à cette explication est le calcium total (18,8%). A 14 jours, la variation globale du taux de survie d'*E. faecalis* est expliqué à 36,6% et le calcium total (15,6%) ainsi que le phosphore assimilable (10,4%) sont les 2 variables qui participent le plus à cette explication. Le modèle explique 19,7% de variance du taux de survie à 84 jours. Le phosphore assimilable (10%) et le fer libre (9,6%) sont les 2 seules variables qui interviennent dans l'explication de la survie d'*E. faecalis*.

### 3.2. Evaluation de l'effet de la microflore du sol sur la survie d'*E. faecalis* et de son interaction avec le pH et le mode d'usage dans un ensemble de 9 sols

L'impact des communautés bactériennes des sols sur la survie d'*E. faecalis* a été déterminé sur une sélection de 9 sols choisis selon leurs propriétés physico-chimiques et leur mode d'occupation contrastés. Dans les 9 sols non stériles, la population d'*E. faecalis* décline au cours du temps (Figure III-6A). Une survie à long-terme (plus de 84 jours) est observée dans 5 des 9 sols (755, 921, 2191, 1133, 1500). Pour les 4 sols restant (1492, 1709, 765, 881), la population d'*E. faecalis* survit plus de 14 jours mais moins de 84 jours.

La survie d'*E. faecalis* diffère dans les sols stériles comparée aux sols non stériles indiquant un effet de la microflore du sol. En effet, une croissance de 1 à 2 Log est observée dès 7 jours dans les sols 1492, 921 et 755 stériles contrairement aux mêmes sols non stériles (Figure III-6B). Dans le sol 881 stérile, *E. faecalis* ne persiste pas plus de 7 jours alors que cette bactérie survit plus de 14 jours dans le même sol non stérile. De plus, des différences de taux de survie apparaissent également entre les sols stériles. Tandis qu'une croissance d'*E. faecalis* est observée dans 3 des sols stériles (1492, 921 et 755), aucune croissance n'est observée dans les 6 autres sols, et la population d'*E. faecalis* décline en présentant des profils de survie à court-terme (1500, 765, 1709) et à long-terme (1133 et 2191).

Le comportement d'*E. faecalis* est contrasté parmi les 9 sols stériles. L'absence de la microflore endogène ne favorise pas la croissance d'*E. faecalis* dans tous les sols suggérant l'influence d'autres paramètres édaphiques. L'interaction entre les paramètres microflore, pH, et mode d'usage du sol sur la survie d'*E. faecalis* a été évaluée par une ANOVA à mesure répétée (Tableau III-6). Une interaction significative est mise en évidence entre la microflore et le pH du sol ( $F_{2,259} = 121$ ,  $p < 0,001$ ) et explique une grande partie de la variance d'*E. faecalis*. L'effet suppressif de la microflore est significativement mis en évidence uniquement



**Figure III-7. Taux de survie moyen d'*E. faecalis* dans les sols non-stériles et stériles en fonction du pH du sol.**

Les 9 sols ont été divisés également en 3 groupes en fonction de leur pH avec (A) 3 sols présentant un pH < 5,5, (B) 3 sols présentant un pH compris entre 5,5 et 7 et (C) 3 sols présentant un pH > 7. Les taux de survie moyen ont été calculés entre les sols appartenant au même groupe de pH pour chaque jour de prélèvement. Les lignes pleines représentent les taux de survie moyen dans les sols non-stériles et les lignes hachurées représentent les taux de survie moyen dans les sols stériles. Les barres d'erreurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart type calculée avec 3 réplicas.

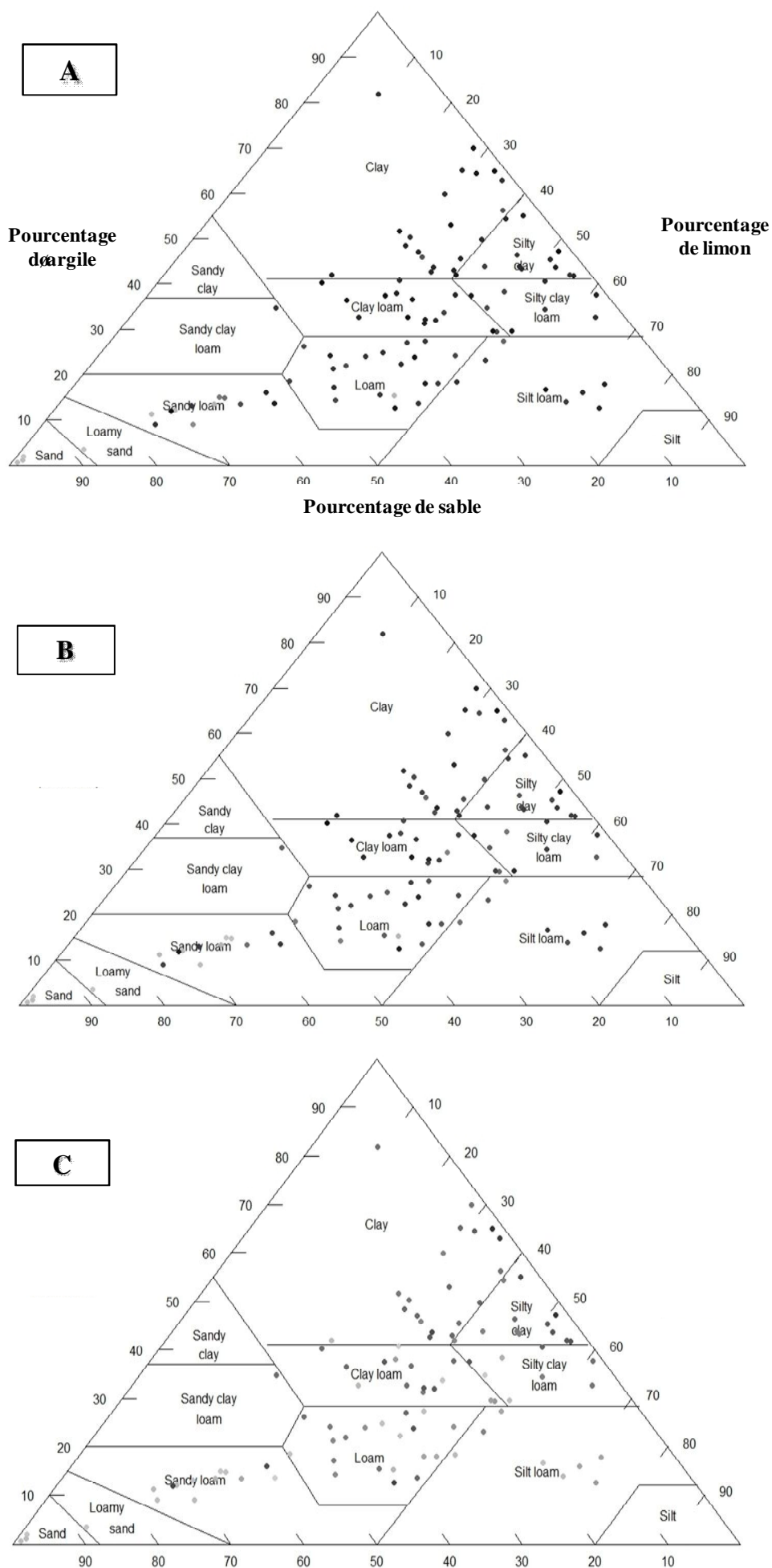
pour les sols dont le pH est supérieur à 7 (Figure III-7C). Pour les sols dont le pH est inférieur à 7, globalement, aucun effet inhibiteur de la microflore n'est mis en évidence sur la survie de *E. faecalis* (Figure III-7A et III-7B). Une interaction significative est également observée entre la microflore et le mode d'usage du sol ( $F_{2,259}=120$ ,  $p < 0,001$ ), mais comme remarqué dans l'article concernant la survie de *L. monocytogenes*, la répartition inégale des valeurs de pH de ces sols au sein des groupes correspondant à leur mode d'usage fausse l'interprétation de cette interaction.

### 3.3. Comparaison de la survie de *E. faecalis* et *L. monocytogenes* dans l'échantillonnage de 100 sols

Dans l'ensemble de 100 sols non stériles, *L. monocytogenes* peut survivre à long-terme dans un plus grand nombre de sol que *E. faecalis*. Dans 71 des sols, *L. monocytogenes* survit plus de 84 jours à des concentrations pouvant atteindre  $1,2 \times 10^4$  bactéries par gramme de sol (Locatelli *et al.* 2013b). En revanche, *E. faecalis* ne survit à long-terme que dans 49 des sols à une concentration maximale de  $8,2 \times 10^2$  bactéries par gramme de sol. De plus, ces taux de survie à 84 jours sont plus faibles que ceux de *L. monocytogenes*, et ce, quelle que soit la texture du sol (Locatelli *et al.* 2013b). De façon intéressante, 44 de ces 49 sols sont communs aux deux modèles bactériens pour la survie à long terme. *E. faecalis* et *L. monocytogenes* présentent tous 2 une survie de moins de 7 jours dans les mêmes 4 sols caractérisés par un faible pH et une forte proportion de sable. De manière générale, l'effet défavorable des sols sableux sur la survie des 2 bactéries est visible dès 7 jours sur la figure représentant le triangle des textures pour *E. faecalis* (Figure III-5) et *L. monocytogenes* (Figure III-8).

### 3.4. Comparaison de la survie de *E. faecalis* et *L. monocytogenes* dans l'échantillonnage de 9 sols

La survie de *E. faecalis* est comparée à la survie de *L. monocytogenes* dans le sous-ensemble de 9 sols non stériles (Figures III-3 et III-6). Comme pour *L. monocytogenes*, une survie à long-terme (plus de 84 jours) est également observée pour *E. faecalis* dans les sols 921, 755, 3191 et 1133 (Locatelli *et al.* 2013b). De même, ces bactéries présentent toutes 2 une survie à court-terme (moins de 84 jours) dans les sols 765 et 1709. Cependant, des différences de survie entre *L. monocytogenes* et *E. faecalis* peuvent être notées. Contrairement



**Figure III-8. Distribution des 100 sols utilisés dans le triangle des textures.**

Les taux de survie de *L. monocytogenes* obtenus pour chacun des 100 sols à 7 (A), 14 (B) et 84 jours (C) sont colorisés avec une échelle de gris, en gris clair les taux de survie les plus faibles, en noir les plus élevés.

à *L. monocytogenes*, *E. faecalis* survit moins de 84 jours après inoculation dans le sol 1492. Tandis que *L. monocytogenes* ne survit pas plus de 14 jours dans le sol 1500, *E. faecalis* y persiste plus de 84 jours. Dans le sol 881, *L. monocytogenes* ne survit pas plus de 7 jours mais *E. faecalis* y est retrouvé plus de 14 jours (Locatelli *et al.* 2013b).

Dans les microcosmes de sols stériles, des similarités apparaissent entre la survie de *E. faecalis* et *L. monocytogenes* (Locatelli *et al.* 2013b). Les sols stériles 1492, 921 et 755 sont les seuls qui favorisent la croissance de *E. faecalis* comme observé pour *L. monocytogenes*. Pour ces 2 bactéries, une survie à long-terme est notée dans le sol 2191 et une survie à court terme dans le sol 1500. Une survie très réduite est observée pour *L. monocytogenes* et *E. faecalis* dans le sol 881. Contrairement à *L. monocytogenes* dont la population décline rapidement, *E. faecalis* survit plus de 14 jours dans les sols 765 et 1709. Dans le sol 1133, *L. monocytogenes* survit plus de 14 mais moins de 84 jours tandis qu'une survie à long-terme est observée pour *E. faecalis*.

Pour définir s'il y a une différence du taux de survie entre *E. faecalis* et *L. monocytogenes* en fonction du pH, du mode d'usage et de la présence de la microflore indigène du sol, une ANOVA à mesures répétées est réalisée (Tableau III-6). Seules les interactions triples seront analysées afin de ne pas perdre d'information par rapport aux interactions doubles. Une interaction triple significative est détectée entre le type de microorganisme, la durée de survie (7, 14 ou 84 jours) et la stérilisation du sol ( $F_{2,259} = 13,57$  ;  $p < 0.001$ ). D'autre part, la triple interaction pH du sol, présence de la microflore et la durée de survie (7, 14 ou 84 jours) apparaît également significative ( $F_{2,259} = 9,33$  ;  $p < 0.001$ ).

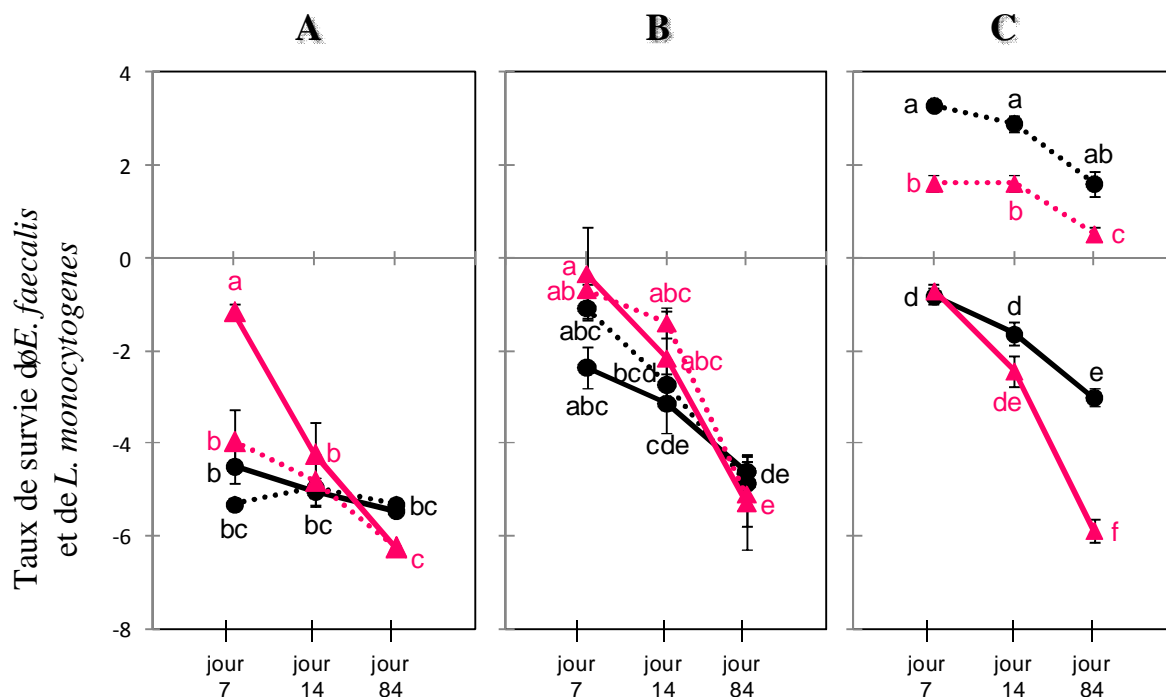
Plus précisément, la figure III-9 indique que :

- Dans les sols présentant un pH inférieur à 5,5 (Figure III-9A), *E. faecalis* présente un taux de survie supérieur à *L. monocytogenes* à 7 jours dans les sols non stériles. A 14 et 84 jours, aucune différence significative n'est notée entre les taux de survie de *E. faecalis* et *L. monocytogenes* dans les sols stériles et non stériles.

- Pour les sols présentant un pH compris entre 5,5 et 7 (Figure III-9B), aucune différence n'est observée entre *E. faecalis* et *L. monocytogenes* dans les sols stériles et non stériles et ce à chaque temps de prélèvement (7, 14 et 84 jours).

- Pour les sols présentant un pH supérieur à 7 (Figure III-9C), *L. monocytogenes* survit significativement mieux dans les sols stériles que *E. faecalis* à tous les points de prélèvement.





**Figure III-9. Comparaison des taux de survie moyens entre *L. monocytogenes* et *E. faecalis* dans les sols non-stériles et stériles en fonction du pH du sol.**

Les 9 sols ont été divisés également en 3 groupes en fonction de leur pH avec (A) 3 sols présentant un pH < 5,5, (B) 3 sols présentant un pH compris entre 5,5 et 7 et (C) 3 sols présentant un pH > 7. Les taux de survie moyen ont été calculés pour *L. monocytogenes* (symboles noirs) et *E. faecalis* (symboles roses) entre les sols appartenant au même groupe de pH pour chaque jour de prélèvement. Les lignes pleines représentent les taux de survie moyen dans les sols non-stériles et les lignes hachurées représentent les taux de survie moyen dans les sols stériles. Les barres d'erreurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart type calculé avec 3 réplicas.

Dans les mêmes sols non stériles, la survie de *L. monocytogenes* est similaire à celle de *E. faecalis* à 7 et 14 jours mais à 84 jours, la survie de *L. monocytogenes* devient significativement supérieure à celle de *E. faecalis*.

## 4. Discussion

### 4.1. Etude des paramètres du sol influençant la survie de *E. faecalis*

Les études rapportant la survie de *E. faecalis* dans le sol sont rares et la plupart sont assez anciennes (Mallmann and Litsky 1951; Bergner-Rabinowitz 1956; Van Donsel *et al.* 1967; Kibbey *et al.* 1978; Cools *et al.* 2001). Dans notre étude, la population de *E. faecalis* décroît au cours du temps dans les 100 sols non stériles incubés à 20°C. Cette tendance de déclin a déjà été observée pour différents types de sols, notamment lorsque la température d'incubation est supérieure à 15°C (Kibbey *et al.* 1978; Cools *et al.* 2001). *E. faecalis* se comporte différemment en fonction des 100 sols testés et peut soit présenter une survie à long terme, une survie à court terme ou dans quelques sols, une absence de survie. Dans 2 études conduites à 25°C, des durées de survie contrastées pouvant aller de 35 à plus de 120 jours en fonction du type de sol ont été notées, comme déterminé dans notre étude (Kibbey *et al.* 1978; Cools *et al.* 2001). D'après la représentation de l'intensité des taux de survie de *E. faecalis* dans les 100 sols positionnés sur le triangle des textures (Figure III-5), les sols sableux apparaissent défavorables à la survie de *E. faecalis* dès 7 jours après inoculation. Cette observation est en accord avec d'autres travaux qui indiquent que les durées de survie les plus courtes pour les sols contenant de fortes proportions de sable (Mallmann and Litsky 1951; Kibbey *et al.* 1978; Cools *et al.* 2001). Cools *et al.*, (2001), rapportent une persistance réduite de *E. faecalis* dans un sol sableux comparé à un sol limoneux et limono-sableux (Cools *et al.* 2001). Dans cette étude, outre l'effet de la texture, la survie de *E. faecalis* peut également être attribué au pH de ces 3 sols car le sol sableux présente le plus faible pH (4,6) et le sol limoneux le plus élevé (6,7). Dans ce cas, il est difficile de séparer l'effet du pH de celui de la texture des sols. Cependant, l'effet prépondérant du pH par rapport à la texture est mis en évidence dans l'étude de Kibbey *et al.*, (1978) (Kibbey *et al.* 1978). La survie de *E. faecalis* atteint 35 jours et 65 jours pour 2 sols présentant un pH de 4,5 et 5,2 correspondant à un sol sablo-limoneux et à un sol limono-argileux fin respectivement. Pour les autres sols de l'étude présentant un pH supérieur à 6, incluant un sol limono-argileux fin, la survie de *E. faecalis* dépasse 100 jours (Kibbey *et al.* 1978). Dans notre étude, 5% des sols sont défavorables à la

survie d'*E. faecalis* car il n'est plus détecté dès 7 jours après inoculation. Ces sols sont tous caractérisés par un pH compris entre 4 et 4,5 et une texture sableuse.

Le modèle de régression établi afin de corréler la survie d'*E. faecalis* aux propriétés édaphiques des sols souligne l'importance des paramètres chimiques dans la variance de la survie d'*E. faecalis* à court terme et à long terme. Le calcium est la variable qui explique la majorité du taux de survie aux jours 7 et 14, les sols les plus pauvres en calcium total (carbonate calcium) étant favorables à la survie de cette bactérie. Les sols très calcaires seraient donc peu favorables à la survie d'*E. faecalis*. Le phosphore assimilable est le principal facteur influençant la variabilité de survie d'*E. faecalis* à 84 jours mais cette variable apparaît aussi dans les paramètres les plus déterminants aux jours 7 et 14. La récurrence des variables calcium total et phosphore assimilable aux différents temps de prélèvement dans le modèle prouve l'influence de ces facteurs sur la survie d'*E. faecalis* en général. Ces résultats sont inattendus car les corrélations trouvées pour le calcium total et le phosphore assimilable sont négatives. En effet, ces éléments font partie des minéraux indispensables à la croissance bactérienne. Aucune donnée dans la littérature n'a pu expliquer l'impact négatif du calcium et du phosphore sur la survie d'*E. faecalis*. La variable sable apparaît dans le modèle de régression linéaire comme la 3<sup>ème</sup> variable explicative qui explique la variation de survie d'*E. faecalis* à 14 jours. Cette variable est corrélée négativement à la survie d'*E. faecalis*. Ce résultat confirme la tendance précédemment observée dans le triangle des textures qui associe de faibles taux de survie pour les sols sableux.

Le modèle est moins performant pour expliquer les variations de la survie d'*E. faecalis* à long terme. Plusieurs raisons peuvent être envisagées quant au manque d'efficacité du modèle à corréler la survie d'*E. faecalis* aux paramètres du sols. D'une part, d'autres paramètres que ceux rentrés dans le modèle, telle que la microflore, peuvent contribuer à l'explication de la variance de la survie d'*E. faecalis* dans les sols. D'autre part, des études antérieures ont démontré que, lorsqu'il est libéré dans l'environnement, *E. faecalis* peut rentrer dans un état VNC en réponse à des conditions défavorables (oligotrophie du milieu et basses températures) (del Mar Lleo *et al.* 1998; Lleo *et al.* 1999). Il est possible qu'*E. faecalis* soit, au cours du temps de l'expérience, entré sous forme VNC dans certains des sols ce qui expliquerait qu'une partie de la variabilité de sa survie ne peut être expliquée.

L'expérience conduite sur un échantillonnage de 9 sols prouve l'influence de la microflore du sol sur la survie d'*E. faecalis*. *E. faecalis* est capable de croître dans 3 des sols

en absence de la microflore mettant en évidence le rôle suppresseur de celle-ci dans les mêmes sols non stériles. Actuellement, aucune étude n'a décrit le comportement d'*E. faecalis* dans des sols stériles. Cependant, pour d'autres espèces de bactéries pathogènes telles que *L. monocytogenes* (Botzler *et al.* 1974; Dowe *et al.* 1997; McLaughlin *et al.* 2011), *Salmonella* spp. (You *et al.* 2006) et *E. coli* O157:H7 (Jiang *et al.* 2002), l'absence de microflore favorise également leur croissance dans le sol. En revanche, l'effet de la microflore du compost a été mis en évidence sur la survie d'*E. faecalis* et peut être comparé aux résultats de notre étude (Paniel *et al.* 2010). Une croissance est observée dans le compost stérile sur une période de 8 jours et après 90 jours d'incubation la population d'*E. faecalis* est toujours supérieure à l'inoculum de départ (Paniel *et al.* 2010). Dans notre étude cependant, aucune croissance d'*E. faecalis* n'est observée pour 6 des 9 sols stérilisés. Ces sols présentent donc des paramètres physico-chimiques qui ne permettent pas la croissance d'*E. faecalis*, même en absence de la microflore. L'ANOVA à mesures répétées indique un effet fortement significatif du pH qui apparaît comme le principal facteur expliquant la différence de comportement d'*E. faecalis* dans les 9 sols stériles. L'interaction entre le pH et la microflore du sol est fortement significative. L'effet suppressif de la microflore sur la survie d'*E. faecalis* est la plus forte dans les sols présentant un pH compris entre 7 et 8.

#### 4.1. Comparaison de la survie d'*E. faecalis* et de *L. monocytogenes*

D'un point de vue environnemental, *E. faecalis* et *L. monocytogenes* partagent la caractéristique d'être ubiquistes dans la nature (Fenlon 1999; Byappanahalli *et al.* 2012a). Ces 2 bactéries peuvent être isolées de milieux aquatiques (Lyautey *et al.* 2007; Lyautey *et al.* 2012; Micallef *et al.* 2012), de végétation (Welshimer 1960; Micallef *et al.* 2012; Valenzuela *et al.* 2012) et du sol (Welshimer and Donker-Voet 1971; Weis and Seeliger 1975; Welshimer 1975; Byappanahalli *et al.* 2006; Byappanahalli *et al.* 2012a; Byappanahalli *et al.* 2012b). Dans certains cas, la présence d'*E. faecalis* et *L. monocytogenes* dans le sol n'est pas associée à une contamination fécale ce qui confirme que le sol peut constituer un véritable habitat pour ces bactéries (Fujioka *et al.* 1998; Oliver *et al.* 2007; Byappanahalli *et al.* 2012b). Dans cette étude, la survie d'*E. faecalis* a été comparée avec la survie de *L. monocytogenes* dans l'échantillonnage de 100 sols.

La comparaison de la survie d'*E. faecalis* et de *L. monocytogenes* dans cet échantillonnage de 100 sols permet de dégager des tendances communes entre les deux

modèles bactériens. Tout d'abord, un ensemble de 44 sols est favorable à la survie des deux modèles bactériens. Ceci pourrait suggérer l'existence de certains contextes pédologiques plus particulièrement sensibles à l'invasion par des pathogènes humains. Par ailleurs, *L. monocytogenes* et *E. faecalis* ont une survie limitée dans les sols sableux présentant une texture grossière et un pH < 5,5. Ce constat est confirmé par de précédentes études qui rapportent une survie réduite d'*E. faecalis* (Mallmann and Litsky 1951; Kibbey *et al.* 1978; Cools *et al.* 2001) et de *L. monocytogenes* (Dowe *et al.* 1997; Nicholson *et al.* 2005) dans les sols sableux comparée aux sols présentant une texture plus fine. D'autres bactéries pathogènes telles que *Salmonella* spp. et *E. coli* suivent également la même tendance de survie dans les sols sableux (Fenlon *et al.* 2000; Nicholson *et al.* 2005; Franz *et al.* 2008).

Cependant, l'ensemble des analyses statistiques réalisées indique des différences dans leur capacité de survie dans les sols. La première différence majeure entre les 2 bactéries est que *L. monocytogenes* survit à long terme dans un nombre significativement plus important de sols qu'*E. faecalis*. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour justifier cette différence.

*E. faecalis* et *L. monocytogenes* sont des bactéries chez lesquelles le stade de VNC peut être induit lors de stress de différentes natures (pH acide, forte concentration en éthanol, exposition aux UV, carence en nutriments) (Besnard *et al.* 2002; Cunningham *et al.* 2009; Lindbäck *et al.* 2010; Gin and Goh 2013). On peut alors supposer qu'*E. faecalis* entre plus rapidement en stade VNC que *L. monocytogenes* résultant en une absence de détection à 84 jours dans la moitié des sols tandis que *L. monocytogenes* est encore détectable par méthode culturale. Cependant, cette hypothèse est difficile à vérifier car aucun auteur n'a évalué dans une même étude et pour les deux bactéries le temps respectif pour entrer dans un stade VNC sous l'influence du même stress.

Une autre hypothèse serait qu'*E. faecalis* ne persiste pas sous forme VNC dans les microcosmes mais meurt et ce, plus rapidement que *L. monocytogenes*. Dans ce cas, *L. monocytogenes* disposerait d'un potentiel d'adaptation plus performant qu'*E. faecalis* lui permettant de survivre plus longtemps dans les sols. *L. monocytogenes* est peut-être plus compétitive qu'*E. faecalis* vis-à-vis de la microflore indigène du sol. Cette compétitivité peut se manifester sous plusieurs formes : (i) Résistance aux substances inhibitrices produites par la microflore indigène, (ii) Assimilation des substrats spécifiques aux milieux environnementaux (chitine, cellulose...). Cette compétitivité plus performante permettrait à *L.*

*monocytogenes* de coloniser plus efficacement les niches dans le microcosme sol et, finalement, d'ý survivre plus longtemps qu'Ø*E. faecalis*.

La différence observée entre les durées de survie des 2 bactéries dans les sols apparaît également dans le modèle de régression linéaire. Les paramètres des sols utilisés dans le modèle expliquent mieux la survie de *L. monocytogenes* que la survie d'Ø*E. faecalis*. Ceci indique que la survie des 2 bactéries n'øst pas déterminée par les mêmes facteurs édaphiques. Tandis que les facteurs BCSR (taux de saturation en cations basiques), CEC et calcium échangeable, relatifs à la fertilité et à la composition du sol, influencent positivement la survie de *L. monocytogenes*, aucun de ces facteurs ne ressort dans le modèle de régression linéaire de la survie d'Ø*E. faecalis*

En conclusion, bien que certaines similarités soient observées dans la survie de *L. monocytogenes* et *E. faecalis* dans les sols, cette étude met en évidence des différences de comportement de ces deux modèles de bactéries ubiquistes en fonction des caractéristiques édaphiques de leur environnement.

## 5. Références bibliographiques

**Badgley, B. D., Nayak, B. S. & Harwood, V. J. (2010).** The importance of sediment and submerged aquatic vegetation as potential habitats for persistent strains of enterococci in a subtropical watershed. *Water research* **44**, 5857-5866.

**Bergner-Rabinowitz, S. (1956).** The survival of coliforms, *Streptococcus faecalis* and *Salmonella tennessee* in the soil and climate of Israel. *Applied microbiology* **4**, 101.

**Besnard, V., Federighi, M., Declerq, E., Jugiau, F. & Cappelier, J.-M. (2002).** Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Veterinary research* **33**, 359-370.

**Botzler, R. G., Cowan, A. B. & Wetzler, T. F. (1974).** Survival of *Listeria monocytogenes* in soil and water. *Journal of Wildlife Diseases* **10**, 204-212.

**Byappanahalli, M. N., Whitman, R. L., Shively, D. A., Sadowsky, M. J. & Ishii, S. (2006).** Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. *Environmental Microbiology* **8**, 504-513.

**Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R. & Harwood, V. J. (2012a).** Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**, 685-706.

**Byappanahalli, M. N., Roll, B. M. & Fujioka, R. S. (2012b).** Evidence for occurrence, persistence, and growth potential of *Escherichia coli* and enterococci in Hawaii's soil environments. *Microbes and Environments* **27**, 164-170.

- Castillo-Rojas, G., Mazari-Hiriart, M., de Leon, S. P., Amieva-Fernandez, R. I., Agis-Juarez, R. A., Huebner, J. & Lopez-Vidal, Y. (2013).** Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from water and clinical samples: antimicrobial susceptibility and genetic relationships. *PloS one* **8**, e59491.
- Chenoweth, C. & Schaberg, D. (1990).** The epidemiology of enterococci. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **9**, 80-89.
- Cools, D., Merckx, R., Vlassak, K. & Verhaegen, J. (2001).** Survival of *E. coli* and *Enterococcus* spp. derived from pig slurry in soils of different texture. *Applied Soil Ecology* **17**, 53-62.
- Cunningham, E., O'Byrne, C. & Oliver, J. D. (2009).** Effect of weak acids on *Listeria monocytogenes* survival: Evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH. *Food control* **20**, 1141-1144.
- del Mar Lleo, M., Tafi, M. C. & Canepari, P. (1998).** Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growth. *Systematic and applied microbiology* **21**, 333-339.
- Dowe, M. J., Jackson, E. D., Mori, J. G. & Bell, C. R. (1997).** *Listeria monocytogenes* survival in soil and incidence in agricultural soils. *Journal of Food Protection* **60**, 1201-1207.
- Edmond, M. B., Wallace, S. E., McClish, D. K., Pfaller, M. A., Jones, R. N. & Wenzel, R. P. (1999).** Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clinical Infectious Diseases* **29**, 239-244.
- Fenlon, D. R. (1999).** *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, pp. 21-37. Edited by E. Ryser & E. Marth. New York: Dekker Marcel.
- Fenlon, D. R., Ogden, I. D., Vinten, A. & Svoboda, I. (2000).** The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 149S-156S.
- Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H. & Stiles, M. E. (1999).** Enterococci at the crossroads of food safety? *International journal of food microbiology* **47**, 1-24.
- Franz, E., Semenov, A. V., Termorshuizen, A. J., de Vos, O. J., Bokhorst, J. G. & van Bruggen, A. H. C. (2008).** Manure-amended soil characteristics affecting the survival of *E. coli* O157 : H7 in 36 Dutch soils. *Environmental Microbiology* **10**, 313-327.
- Fujioka, R., Sian-Denton, C., Borja, M., Castro, J. & Morphew, K. (1998).** Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and enterococci in Guam's streams. *Journal of applied microbiology* **85**, 83S-89S.
- Gin, K. Y.-H. & Goh, S. G. (2013).** Modeling the effect of light and salinity on viable but non-culturable (VBNC) *Enterococcus*. *Water research*.
- Jett, B. D., Huycke, M. M. & Gilmore, M. S. (1994).** Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* **7**, 462-478.
- Jiang, X. P., Morgan, J. & Doyle, M. P. (2002).** Fate of *Escherichia coli* O157 : H7 in manure-amended soil. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2605-2609.

**Jolivet, C., D. Arrouays, L. Boulonne, C. Ratié and S. Saby (2006).** Le Réseau de mesures de la qualité des sols de France (RMQS) Etat d'avancement et premiers résultats. *Etude et Gestion des Sols* **13**, 149-164.

**Kibbey, H. J., Hagedorn, C. & McCoy, E. L. (1978).** Use of fecal Streptococci as indicators of pollution in soil. *Applied and environmental microbiology* **35**, 711-717.

**Leclerc, H., Devriese, L. A. & Mossel, D. A. A. (1996).** Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *Journal of Applied Microbiology* **81**, 459-466.

**Lindbäck, T., Rottenberg, M. E., Roche, S. M. & Rorvik, L. M. (2010).** The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Veterinary research* **41**, 1-10.

**Lleo, M., Tafi, M. C., Signoretto, C., Cero, C. & Canepari, P. (1999).** Competitive polymerase chain reaction for quantification of nonculturable *Enterococcus faecalis* cells in lake water. *FEMS microbiology ecology* **30**, 345-353.

**Locatelli, A., Spor, A., Jolivet, C., Piveteau, P. & Hartmann, A. (2013).** Biotic and abiotic soil properties influence survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *PLoS ONE* **8**, e75969.

**Lyautey, E., Lapen, D. R., Wilkes, G., McCleary, K., Pagotto, F., Tyler, K., Hartmann, A., Piveteau, P., Rieu, A. I., Robertson, W. J., Medeiros, D. T., Edge, T. A., Gannon, V. & Topp, E. (2007).** Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the south nation river watershed, Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 5401-5410.

**Lyautey, E., Hartmann, A., Lapen, D. R. & Topp, E. (2012).** A comparison of enrichment and direct-plating methods for isolation of *Listeria monocytogenes* from surface water. *Canadian journal of microbiology* **58**, 1405-1410.

**Mallmann, W. L. & Litsky, W. (1951).** Survival of selected enteric organisms in various types of soil. *American Journal of Public Health and the Nations Health* **41**, 38-44.

**McLaughlin, H., Casey, P., Cotter, J., Gahan, C. & Hill, C. (2011).** Factors affecting survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in soil samples. *Archives of Microbiology* **193**, 775-785.

**Micallef, S. A., Rosenberg Goldstein, R. E., George, A., Ewing, L., Tall, B. D., Boyer, M. S., Joseph, S. W. & Sapkota, A. R. (2012).** Diversity, distribution and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. recovered from tomatoes, leaves, water and soil on US mid-atlantic farms. *Food Microbiology*.

**Mondragon, V. A., Llamas-Pérez, D. F., Gonzalez-Guzman, G. E., Marquez-Gonzalez, A. R., Padilla-Noriega, R., de Jesus Duran-Avelar, M. & Franco, B. (2011).** Identification of *Enterococcus faecalis* bacteria resistant to heavy metals and antibiotics in surface waters of the Mololoa River in Tepic, Nayarit, Mexico. *Environmental monitoring and assessment* **183**, 329-340.

**Nicholson, F. A., Groves, S. J. & Chambers, B. J. (2005).** Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology* **96**, 135-143.

**Noble, C. J. (1978).** Carriage of group D streptococci in the human bowel. *Journal of clinical pathology* **31**, 1182-1186.



**Oliver, H. F., Wiedmann, M. & J., B. K. (2007).** Environmental reservoir and transmission into the mammalian host. In *Listeria monocytogenes : Pathogenesis and Host Response*, pp. pp 111-137 Edited by H. Goldfine & H. Shen: Springer.

**Paniel, N., Rousseaux, S., Gourland, P., Poitrenaud, M. & Guzzo, J. (2010).** Assessment of survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Infantis* and *Enterococcus faecalis* artificially inoculated into experimental waste or compost. *Journal of applied microbiology* **108**, 1797-1809.

**Ranjard, L., Dequiedt, S., Jolivet, C., Saby, N. P. A., Thioulouse, J., Harmand, J., Loisel, P., Rapaport, A., Fall, S., Simonet, P., Joffre, R., Boure, N. C. P., Maron, P. A., Mougél, C., Martin, M. P., Toutain, B., Arrouays, D. & Lemanceau, P. (2009).** Biogeography of soil microbial communities: a review and a description of the ongoing french national initiative. *Agronomy for Sustainable Development* **30**, 359-365.

**USEPA (2004).** Water quality standards for coastal and great Lakes recreation waters. *Environmental Protection Agency*, 67218-67243.

**Valenzuela, A. S., Benomar, N., Abriouel, H., Pulido, R. P., Canamero, M. M. & Galvez, A. (2012).** Characterization of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from wild flowers. *Antonie van Leeuwenhoek* **101**, 701-711.

**Van Donsel, D. J., Geldreich, E. E. & Clarke, N. A. (1967).** Seasonal variations in survival of indicator bacteria in soil and their contribution to storm-water pollution. *Applied Microbiology* **15**, 1362-1370.

**Weis, J. & Seeliger, H. P. R. (1975).** Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Applied Microbiology* **30**, 29-32.

**Welshimer, H. J. (1960).** Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *Journal of Bacteriology* **80**, 316-320.

**Welshimer, H. J. & Donker-Voet, J. (1971).** *Listeria monocytogenes* in Nature. *Applied Microbiology* **21**, 516-519.

**Welshimer, H. J. (1975).** *Listeria* in nature. *Problems of listeriosis*, 59-60.

**Wheeler, A. L., Hartel, P. G., Godfrey, D. G., Hill, J. L. & Segars, W. I. (2002).** Potential of as a human fecal indicator for microbial source tracking. *Journal of Environmental Quality* **31**, 1286-1293.

**You, Y., Rankin, S. C., Aceto, H. W., Benson, C. E., Toth, J. D. & Dou, Z. (2006).** Survival of *Salmonella enterica* serovar Newport in manure and manure-amended soils. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 5777-5783.

## **Partie IV**

### ***Discussion générale et perspectives***

## Partie IV : Discussion générale et perspectives

La circulation des bactéries pathogènes dans l'environnement se fait à travers de nombreux hôtes et compartiments. Le sol est un compartiment qui joue un rôle central dans le cycle de transmission des pathogènes car il peut assurer leur survie (rôle de réservoir) et permettre leur dissémination vers les animaux, les végétaux et les ressources en eau. L'évaluation du risque du transfert des bactéries pathogènes du sol aux denrées alimentaires et aux ressources en eau est déterminante en termes de santé publique.

Dans ce cadre, l'objectif de mes travaux était d'identifier les paramètres pédoclimatiques déterminant l'incidence et la survie dans les sols d'une bactérie pathogène stricte : *L. monocytogenes* et d'une bactérie pathogène opportuniste : *E. faecalis*.

L'originalité de cette étude a été de travailler sur un nombre conséquent de sols afin de couvrir l'ensemble des possibilités aux niveaux de la pédologie (propriétés physico-chimiques) et du mode d'occupation des sols. Nous nous sommes appuyés sur le RMQS et avons bénéficié de la grande diversité des échantillons de sol du conservatoire des sols français géré par l'unité Infosol de l'INRA d'Orléans. De plus, nous avons collaboré avec la plateforme GenoSol qui est en charge de l'extraction et de la conservation des ADN issus de tous les sols du RMQS.

Les avantages majeurs du partenariat avec le RMQS et la plateforme GenoSol résidaient dans le fait que :

- Les sols étaient déjà prélevés et disponibles pour être utilisés dans notre étude. Ces sols, prélevés sur tout le territoire français sont représentatifs de la diversité pédologique en France.
- Les analyses physico-chimiques avaient déjà été réalisées pour l'ensemble des sols et les données relatives au mode d'occupation, à l'ajout d'amendement, au climat étaient disponibles.
- Les ADN étaient déjà extraits de tous les sols et disponibles pour réaliser des analyses.

La détection et la quantification de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis* a pu être réalisée dans un grand nombre d'ADN (é 1200) extraits d'une grande diversité de sols

présentant une grande variabilité d'un point de vue classe texturale, paramètres chimiques et mode d'occupation. L'ensemble des résultats des analyses PCR indiquent que si *L. monocytogenes* et *E. faecalis* sont présents dans les sols, leur concentration respective est inférieure à la limite de détection des systèmes de détection moléculaire que nous avons mis au point au cours de ce travail de thèse. Bien que la méthode de PCR quantitative soit sensible, cette méthode sous-estime la présence globale de ces 2 bactéries pathogènes dans les sols. Cette observation est principalement notée pour *L. monocytogenes*. En effet, la recherche de *L. monocytogenes* par microbiologie classique *via* un enrichissement permet la mise en évidence du pathogène dans un plus grand nombre de sols que par PCR quantitative. La méthode de détection culturale par enrichissement apparaît donc plus sensible que la PCR quantitative. Cependant, les méthodes de microbiologie classique nécessitent du temps pour la croissance bactérienne et une confirmation biochimique ou moléculaire des colonies suspectes isolées. Pour ces raisons, l'emploi de méthodes de microbiologie classique n'est pas compatible avec l'analyse d'un grand nombre de sols. Par le biais de la PCR quantitative, il n'a pas été possible de corrélérer l'incidence de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis* avec les propriétés pédoclimatiques des sols.

Pour pallier à ce problème, nous avons employé une méthode culturale pour suivre la survie de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis* dans 100 sols dont les propriétés pédo-climatiques et le mode d'usage étaient caractérisés. Cette approche a permis de mettre en évidence les facteurs clés des sols qui influencent la survie de ces 2 bactéries pathogènes dans les sols.

Cette étude a tout d'abord montré que les sols sableux présentant un pH acide étaient défavorables à la survie de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis*. *L. monocytogenes* est capable de survivre à long terme dans un plus grand nombre de sols qu'*E. faecalis*. Cependant, la majorité des sols propices à la survie à long terme est commune aux deux pathogènes. Bien que la famille des propriétés chimiques des sols apparaisse comme la plus déterminante pour la survie de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis*, les variables de poids au sein de cette famille sont différentes entre les 2 bactéries. Pour *L. monocytogenes*, la survie à court terme est positivement corrélée au taux de saturation en cations basiques, à la capacité d'échange cationique et à la concentration en calcium échangeable tandis que la survie à long terme est positivement corrélée à la teneur en argile. En revanche, pour *E. faecalis*, une corrélation négative avec la teneur en calcium totale explique la majorité de la variation de survie à court terme alors que la survie à long terme est négativement corrélée à la concentration en phosphore assimilable. Les analyses statistiques ont démontré que le climat et le mode

d'usage des sols n'influençaient pas la survie de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis* dans notre étude. Ceci n'est pas surprenant et peut s'expliquer par le fait que les microcosmes de sols réalisés pour le suivi de la survie des 2 bactéries pathogènes n'étaient pas soumis de manière directe au climat et au mode d'usage caractérisant initialement les sols lors de leur prélèvement. L'effet global de la microflore du sol a été évalué sur la survie de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis* en comparant la dynamique des populations dans des microcosmes de sols stérilisés ou non stérilisés. Un effet suppresseur de la microflore statistiquement significatif est observé pour les sols présentant un pH supérieur à 7 pour les 2 pathogènes. Finalement, l'approche par détermination de la survie de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis* dans un ensemble de 100 sols nous a permis d'identifier les propriétés texturales et chimiques influençant la survie des 2 pathogènes. Afin d'intégrer dans le modèle de partition de variance à poids égal les paramètres microbiologiques, climatiques, et le mode d'usage des sols, d'autres expériences doivent être menées.

Nous avons mis en évidence un important effet de la microflore du sol sur la survie des deux pathogènes. Afin de mieux caractériser cet effet, il serait intéressant, dans un premier temps, d'étudier la survie de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis* dans l'ensemble des 100 sols stérilisés. Ceci permettrait de généraliser l'interaction observée entre le pH du sol et l'effet des microorganismes endogènes sur la survie des 2 pathogènes. Dans un second temps, l'effet à proprement parler de la composition et de la diversité des communautés bactériennes du sol sur la survie de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis* pourrait être examiné par une approche de dilution-extinction. Cette approche vise à extraire les communautés bactériennes d'un sol pour les diluer et de ré-implanter les différentes dilutions dans le sol originel stérile. Pour chaque dilution des communautés bactériennes, la caractérisation de la composition et de la diversité pourrait être réalisée par la technique de pyroséquençage. L'approche de dilution-extinction a déjà été utilisée pour étudier la survie de bactéries pathogènes strictes comme *E. coli* O157:H7 (van Elsas *et al.* 2007; van Elsas *et al.* 2012) et *L. monocytogenes* (Vivant *et al.* 2013) et une bactérie pathogène opportuniste : *Pseudomonas aeruginosa* (Matos *et al.* 2005).

Dans nos analyses statistiques, les données climatiques et le mode d'usage des sols n'influencent pas la survie de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis*. De manière à affirmer ou infirmer ce résultat, d'autres expériences pourraient être conduites. Pour étudier l'effet du climat sur la survie de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis* dans différents types de sols, une approche expérimentale au laboratoire peut être envisagée en incubant des microcosmes de sols dans des chambres à températures et humidités contrôlées. Ainsi, l'effet de l'interaction

du climat et de la pédologie des sols sur la survie des 2 pathogènes serait étudié. Si l'effet du type de sol a déjà été examiné pour *L. monocytogenes*, dans des conditions au laboratoire, aucune étude ne rapporte l'effet de l'humidité et de la température sur la survie de *L. monocytogenes* dans des sols de textures variées. Bien qu'il existe des données sur la survie de *Enterococcus* spp. dans 3 différents types de sols en fonction de la température, l'humidité n'est pas incluse dans l'expérience et les conclusions ne peuvent être généralisées à *E. faecalis* (Cools *et al.* 2001). A l'inverse, dans une autre étude, la survie de *E. faecalis* est suivie dans 5 sols de différentes textures pour 2 conditions d'humidité mais la température d'incubation durant toute l'expérimentation reste à 25°C (Kibbey *et al.* 1978). Pour *E. faecalis* également, aucune étude n'a étudié simultanément l'effet du type de sol et du climat. Il pourrait être envisagé de faire varier, en condition de laboratoire, la température et/ou l'humidité au cours du temps afin de simuler les variations climatiques saisonnières comme déjà réalisé pour *Salmonella* spp. (Holley *et al.* 2006). Enfin, l'approche expérimentale en conditions extérieures pourrait également être envisagée afin d'estimer la survie des bactéries pathogènes dans des conditions climatiques réelles. En extérieur, en plus d'intégrer les températures et l'humidité aux analyses statistiques, les durées d'ensoleillement pourraient être considérées dans la modélisation de la survie bactérienne.

L'effet du mode d'usage des sols sur la survie bactérienne pourra être approfondi en mesurant la survie de bactéries pathogènes dans des conteneurs de sols dont la surface serait cultivée avec les plantes céréalières les plus cultivées en France ou dont la surface serait recouverte d'herbe. L'intégration du couvert végétal dans un modèle prévisionnel de survie des bactéries pathogènes est un élément d'importance car l'effet rhizosphère sur la survie des bactéries pathogènes est spécifique à l'espèce végétale (Gagliardi and Karns 2002b; Ongeng *et al.* 2011a; Ongeng *et al.* 2011b).

Un aspect autre que celui lié aux paramètres pédoclimatiques mais inhérent à la souche de la bactérie pathogène pourrait être étudié avec plus de précision. Dans notre étude, nous avons utilisé 2 souches de laboratoire pour *L. monocytogenes* et *E. faecalis* mais il serait intéressant d'évaluer l'effet du génotype de la souche bactérienne sur le potentiel de survie de ces 2 pathogènes dans différents types de sols. Des différences de comportement ont déjà été observées dans des sols non stériles entre 2 souches de *L. monocytogenes* (Botzler *et al.* 1974). Pour *E. coli* O157, la variabilité du potentiel de survie dans le sol a aussi été démontré entre différentes souches (Franz *et al.* 2011). L'utilisation de souches provenant de différentes origines (environnement, échantillons cliniques, aliments..) permettrait de voir si certain

génotypes chez *L. monocytogenes* ou *E. faecalis* sont plus spécifiquement adaptés à la survie dans le sol que d'autres.

Dans notre démarche expérimentale, nous avons analysé par PCR quantitative et microbiologie classique la présence de *L. monocytogenes* et *E. faecalis* dans un grand ensemble de sols. Un seul prélèvement a été réalisé pour tous les sols à un instant donné mais l'absence de bactéries pathogènes à ce moment ne signifie pas qu'elles n'ont jamais été présentes dans ces sols. Cette démarche n'est pas suffisante pour évaluer l'écologie des bactéries pathogènes dans les sols. Une démarche sur le long terme (plusieurs années) aboutissant à un suivi temporel avec des prélèvements périodiques pourrait apporter des informations plus précises sur la circulation de *L. monocytogenes* et *E. faecalis* dans le sol. Cette approche de prélèvements réguliers sur le long terme a déjà été réalisée pour *L. monocytogenes* sur des sites d'élevage et agricoles et permet d'observer des fluctuations dans l'isolement des souches dans les sols en fonction de l'année de prélèvement (Welshimer and Donker-Voet 1971; Nightingale *et al.* 2004).

Pour finir, il serait primordial d'évaluer le risque de contamination réel de l'Homme lié à la présence de *L. monocytogenes* et *E. faecalis* dans les sols. Par exemple, il faudrait comparer le génotype des souches isolées dans les sols d'une région avec le génotype des souches impliquées dans les infections humaines dans la même localité. Ainsi, il serait possible de déterminer si des souches environnementales peuvent être à l'origine d'infections chez l'Homme. L'analyse de la virulence de souches isolées de l'environnement pourrait également permettre de mieux estimer ces risques.

En conclusion, comme le montre ce travail, le sol peut constituer un compartiment central dans la circulation des bactéries pathogènes de l'Homme dans la biosphère. Dans un contexte d'assurance de la sécurité sanitaire des populations, prendre en compte ces phénomènes de transmission de bactéries pathogènes d'un compartiment à l'autre et plus généralement de leur circulation dans la biosphère apparaît essentiel. Cela nécessite une meilleure compréhension de l'histoire naturelle et de l'écologie de ces agents pathogènes, notamment dans les agroenvironnements.

## ***Références bibliographiques***



## Références bibliographiques

### - A -

**Abu-Ashour, J., Joy, D., Lee, H., Whiteley, H. & Zelin, S. (1994).** Transport of microorganisms through soil. *Water, Air, and Soil Pollution* **75**, 141-158.

**AFD (2011).** Agence française de développement - Réutilisation des eaux usées traitées - Perspectives opérationnelles et recommandations pour l'action.

**Al-Ghazali, M. R. & Al-Azawi, S. K. (1990).** *Listeria monocytogenes* contamination of crops grown on soil treated with sewage sludge cake. *Journal of Applied Bacteriology* **69**, 642-647.

**Allerberger, F. (2003).** *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **35**, 183-189.

**An, Y.-J., Kampbell, D. H. & Peter Breidenbach, G. (2002).** *Escherichia coli* and total coliforms in water and sediments at lake marinas. *Environmental Pollution* **120**, 771-778.

**Arthurson, V. (2008).** Proper sanitization of sewage sludge: a critical issue for a sustainable society. *Applied and environmental microbiology* **74**, 5267-5275.

**Artz, R. R. E., Townend, J., Brown, K., Towers, W. & Killham, K. (2005).** Soil macropores and compaction control the leaching potential of *Escherichia coli* O157: H7. *Environmental microbiology* **7**, 241-248.

**Aureli, P., Fiorucci, G. C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L. & Salmaso, S. (2000).** An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *New England Journal of Medicine* **342**, 1236-1241.

**Aytac, S. A., Ben, U., Cengiz, C. & Taban, B. M. (2010).** Evaluation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination on leafy green vegetables. *J Food Agric Environ* **8**, 275-279.

### - B -

**Bachelier, G. & Bachelier, G. (1963).** *La vie animale dans les sols*: Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer.

**Bacilio-Jiménez, M., Aguilar-Flores, S., Ventura-Zapata, E., Pérez-Campos, E., Bouquelet, S. & Zenteno, E. (2003).** Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and Soil* **249**, 271-277.

**Badgley, B. D., Nayak, B. S. & Harwood, V. J. (2010).** The importance of sediment and submerged aquatic vegetation as potential habitats for persistent strains of enterococci in a subtropical watershed. *Water research* **44**, 5857-5866.

**Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S. & Vivanco, J. M. (2006).** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 233-266.

**Baker, K. L., Langenheder, S., Nicol, G. W., Ricketts, D., Killham, K., Campbell, C. D. & Prosser, J. I. (2009).** Environmental and spatial characterisation of bacterial community composition in soil to inform sampling strategies. *Soil Biology and Biochemistry* **41**, 2292-2298.

**Barker, J., Humphrey, T. J. & Brown, M. W. R. (2006).** Survival of *Escherichia coli* 0157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS microbiology letters* **173**, 291-295.

**Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G. T. & McMurdo, M. E. T. (2004).** Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and environmental microbiology* **70**, 3575-3581.

**Bassler, H. A., Flood, S. J. A., Livak, K. J., Marmaro, J., Knorr, R. & Batt, C. A. (1995).** Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3724-3728.

**Baudart, J., Lemarchand, K., Brisabois, A. & Lebaron, P. (2000).** Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1544-1552.

**Baxter-Potter, W. R. & Gilliland, M. W. (1988).** Bacterial pollution in runoff from agricultural lands. *Journal of Environmental Quality* **17**, 27-34.

**Bech, T. B., Johnsen, K., Dalsgaard, A., Laegdsmand, M., Jacobsen, O. H. r. & Jacobsen, C. S. (2010).** Transport and distribution of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in loamy and sandy soil monoliths with applied liquid manure. *Applied and environmental microbiology* **76**, 710-714.

**Benachour, A., Muller, C., Dabrowski-Coton, M., Le Breton, Y., Giard, J.-C., Rincé, A., Auffray, Y. & Hartke, A. (2005).** The *Enterococcus faecalis* SigV protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to survival following heat, acid, and ethanol treatments. *Journal of bacteriology* **187**, 1022-1035.

**Berg, G., Eberl, L. & Hartmann, A. (2005).** The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology* **7**, 1673-1685.

**Bergner-Rabinowitz, S. (1956).** The Survival of Coliforms, *Streptococcus faecalis* and *Salmonella tennessee* in the Soil and Climate of Israel. *Applied microbiology* **4**, 101.

**Berrada, H., Soriano, J. M., Pico, Y. & Manes, J. (2006).** Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* **107**, 202-206.

**Besnard, V., Federighi, M. & Cappelletti, J. M. (2000).** Development of a direct viable count procedure for the investigation of VNBC state in *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* **31**, 77-81.

- Besnard, V., Federighi, M., Declerq, E., Jugiau, F. & Cappelier, J.-M. (2002).** Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Veterinary research* **33**, 359-370.
- Beuchat, L. R. (1996).** *Listeria monocytogenes*: Incidence on vegetables. *Food Control* **7**, 223-228.
- Bintrim, S. B., Donohue, T. J., Handelsman, J., Roberts, G. P. & Goodman, R. M. (1997).** Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 277-282.
- Blumenthal, U. J., Mara, D. D., Peasey, A., Ruiz-Palacios, G. & Stott, R. (2000).** Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. *Bulletin of the World Health Organization* **78**, 1104-1116.
- Boes, J., Alban, L., Bagger, J., MÃ¸gelmoose, V., Baggesen, D. L. & Olsen, J. E. (2005).** Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* in slurry applied to clay soil on a Danish swine farm. *Preventive Veterinary Medicine* **69**, 213-228.
- Bond, R. D. & Harris, J. R. (1964).** The influence of the microflora on the physical properties of soils. I. Effects associated with filamentous algae and fungi. *Soil Research* **2**, 111-122.
- Borcard, D. & Legendre, P. (2002).** All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices. *Ecological Modelling* **153**, 51-68.
- Bornert, G. (2000).** Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Médecine Vétérinaire* **151**, 1003-1010.
- Borucki, M. K., Gay, C. C., Reynolds, J., McElwain, K. L., Kim, S. H., Call, D. R. & Knowles, D. P. (2005).** Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* strains from a high-prevalence dairy farm. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 5893-5899.
- Botzler, R. G., Cowan, A. B. & Wetzler, T. F. (1974).** Survival of *Listeria monocytogenes* in soil and water. *Journal of Wildlife Diseases* **10**, 204-212.
- Boutibonnes, P., Giard, J. C., Hartke, A., Thammavongs, B. & Auffray, Y. (1993).** Characterization of the heat shock response in *Enterococcus faecalis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**, 47-55.
- Brandl, M. T., Rosenthal, B. M., Haxo, A. F. & Berk, S. G. (2005).** Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne *Tetrahymena* species. *Applied and environmental microbiology* **71**, 1562-1569.
- Brandl, M. T. (2006).** Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety *Annu Rev Phytopathol* **44**, 367-392.

**Brennan, F. P., O'Flaherty, V., Kramers, G., Grant, J. & Richards, K. G. (2010).** Long-term persistence and leaching of *Escherichia coli* in temperate maritime soils. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 1449-1455.

**Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R. & Swaminathan, B. (2000).** *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 2465-2467.

**Bronick, C. J. & Lal, R. (2005).** Soil structure and management: a review. *Geoderma* **124**, 3-22.

**Bui, X. T., Wolff, A., Madsen, M. & Bang, D. D. (2012).** Interaction between food-borne pathogens (*Campylobacter jejuni*, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes*) and a common soil flagellate (*Cercomonas* sp.). *Journal of Food Research* **1**, p76.

**Byappanahalli, M. N., Whitman, R. L., Shively, D. A., Sadowsky, M. J. & Ishii, S. (2006).** Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. *Environmental Microbiology* **8**, 504-513.

**Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R. & Harwood, V. J. (2012a).** Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**, 685-706.

**Byappanahalli, M. N., Roll, B. M. & Fujioka, R. S. (2012b).** Evidence for occurrence, persistence, and growth potential of *Escherichia coli* and Enterococci in Hawaii's soil environments. *Microbes and Environments* **27**, 164-170.

## - C -

**Callot, G., Chamayou, H., Maertens, C. & L., S. (1982).** *Mieux comprendre les interactions sol-racines*. Paris.

**Calvet, R. (2003).** *Le sol: propriétés et fonctions - Constitution et structure, phénomènes aux interfaces*: France Agricole Editions.

**Castillo-Rojas, G., Mazari-Hiriart, M., de Leon, S. P., Amieva-Fernandez, R. I., Agis-Juarez, R. A., Huebner, J. & Lopez-Vidal, Y. (2013).** Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from water and clinical samples: antimicrobial susceptibility and genetic relationships. *PloS one* **8**, e59491.

**Celico, F., Musilli, I. & Naclerio, G. (2004).** The impacts of pasture-and manure-spreading on microbial groundwater quality in carbonate aquifers. *Environmental Geology* **46**, 233-236.

**Chapman, P. A., Siddons, C. A., Cerdan Malo, A. T. & Harkin, M. A. (1997).** A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiology and infection* **119**, 245-250.

**Chaussod, R., Breuil, M. C., Echairi, A., Nouaïm, R., Nowak, V. & Ranjard, L. (1996).** La qualité biologique des sols. *Evaluation et implications, étude et gestion des sols* **3**, 261-278.

**Chenoweth, C. & Schaberg, D. (1990).** The epidemiology of enterococci. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **9**, 80-89.

**Colburn, K. G., Kaysner, C. A., Abeyta, C. & Wekell, M. M. (1990).** *Listeria* species in a California coast estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 2007-2011.

**Colinon, C., Deredjian, A., Hien, E., Brothier, E., Bouziri, L., Cournoyer, B., Hartman, A., Henry, S., Jolivet, C. & Ranjard, L. (2013).** Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in soil and manure assessed by an ecfX qPCR assay. *Journal of applied microbiology*.

**Collins, M. D., Jones, D., Farrow, J. A. E., Kilpper-Balz, R. & Schleifer, K. H. (1984).** *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**, 220-223.

**Cook, R. & Weisberg, S. (1999).** *Applied Regression, Including Computing and Graphics*: Wiley-Interscience.

**Cools, D., Merckx, R., Vlassak, K. & Verhaegen, J. (2001).** Survival of *E. coli* and *Enterococcus* spp. derived from pig slurry in soils of different texture. *Applied Soil Ecology* **17**, 53-62.

**Corpe, W. A. (1970).** Attachment of marine bacteria to solid surfaces. In *Adhesion in biological systems* pp. 73-87. Edited by M. R. S. New York: Academic Press, Inc., .

**Courtois, G. (2000).** Evolution de la réglementation concernant l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées aspects sanitaires. *Forêt méditerranéenne* **21**, 416-421.

**Crane, S. R. & Moore, J. A. (1986).** Modeling enteric bacterial die-off - A review. *Water Air and Soil Pollution* **27**, 411-439.

**Creti, R., Imperi, M., Bertuccini, L., Fabretti, F., Orefici, G., Di Rosa, R. & Baldassarri, L. (2004).** Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *Journal of medical microbiology* **53**, 13-20.

**Cunningham, E., O'Byrne, C. & Oliver, J. D. (2009).** Effect of weak acids on *Listeria monocytogenes* survival: Evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH. *Food control* **20**, 1141-1144.

**Curriero, F. C., Patz, J. A., Rose, J. B. & Lele, S. (2001).** The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948-1994. *Journal Information* **91**.

**Czeszejko, K., Boguslawska-Was, E., Dabrowski, W., Kaban, S. & Umanski, R. (2003).** Prevalence of *Listeria monocytogenes* in municipal and industrial sewage. *Electron J Pol Agric Univ Environ Dev* **6**.

**- D -**

- Da Silva, M. F., Tiago, I., Veríssimo, A., Boaventura, R. A. R., Nunes, O. C. & Manaia, C. M. (2006).** Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology* **55**, 322-329.
- Danyluk, M. D., Nozawa-Inoue, M., Hristova, K. R., Scow, K. M., Lampinen, B. & Harris, L. J. (2008).** Survival and growth of *Salmonella* Enteritidis PT 30 in almond orchard soils. *Journal of applied microbiology* **104**, 1391-1399.
- Dargatz, D. A., Fedorka-Cray, P. J., Ladely, S. R., Koprak, C. A., Ferris, K. E. & Headrick, M. L. (2003).** Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. isolates from US cattle in feedlots in 1999 and 2000. *Journal of applied microbiology* **95**, 753-761.
- Davies, R. H., Dalziel, R., Gibbens, J. C., Wilesmith, J. W., Ryan, J. M. B., Evans, S. J., Byrne, C., Paiba, G. A., Pascoe, S. J. S. & Teale, C. J. (2004).** National survey for *Salmonella* in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999-2000). *Journal of Applied Microbiology* **96**, 750-760.
- Dazzo, F., Smith, P. & Hubbell, D. (1973).** The influence of manure slurry irrigation on the survival of fecal organisms in Scranton fine sand. *Journal of Environmental Quality* **2**, 470-473.
- Deering, A. J., Mauer, L. J. & Pruitt, R. E. (2012).** Internalization of *E. coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. in plants: A review. *Food Research International* **45**, 567-575.
- del Mar Lleo, M., Tafi, M. C. & Canepari, P. (1998).** Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growth. *Systematic and applied microbiology* **21**, 333-339.
- del Mar Lleo, M., Pierobon, S., Tafi, M. C., Signoretto, C. & Canepari, P. (2000).** mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Applied and environmental microbiology* **66**, 4564-4567.
- Dequiedt, S., Thioulouse, J., Jolivet, C., Saby, N. P. A., Lelievre, M., Maron, P. A., Martin, M. P., Prevost-Boure, N. C., Toutain, B., Arrouays, D., Lemanceau, P. & Ranjard, L. (2009).** Biogeographical patterns of soil bacterial communities. *Environmental Microbiology Reports* **1**, 251-255.
- Dequiedt, S., Saby, N. P. A., Lelievre, M., Jolivet, C., Thioulouse, J., Toutain, B., Arrouays, D., Bispo, A., Lemanceau, P. & Ranjard, L. (2011).** Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Global Ecology and Biogeography* **20**, 641-652.
- Desmarais, T. R., Solo-Gabriele, H. M. & Palmer, C. J. (2002).** Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1165-1172.
- Devriese, L. A., Pot, B. & Collins, M. D. (1993).** Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Microbiology* **75**, 399-408.

**Diez-Gonzalez, F., Callaway, T. R., Kizoulis, M. G. & Russell, J. B. (1998).** Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Science* **281**, 1666-1668.

**Donnelly, C. (1999).** Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. In *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, pp. 225-260. Edited by E. Ryser & E. Marth. New York: Dekker Marcel.

**Doran, J. W. & Linn, D. M. (1979).** Bacteriological quality of runoff water from pastureland. *Applied and Environmental Microbiology* **37**, 985-991.

**Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C. & Martin, P. (2004).** Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 3819-3822.

**Dowe, M. J., Jackson, E. D., Mori, J. G. & Bell, C. R. (1997).** *Listeria monocytogenes* survival in soil and incidence in agricultural soils. *Journal of Food Protection* **60**, 1201-1207.

**Duchaufour, P. (1984).** *Abrégés de pédologie*. Paris.

**Dumontet, S., Scopa, A., Kerje, S. & Krovacek, K. (2001).** The importance of pathogenic organisms in sewage and sewage sludge. *Journal of the Air & Waste Management Association* **51**, 848-860.

**Dungan, R. S., Klein, M. & Leytem, A. B. (2012).** Quantification of bacterial indicators and zoonotic pathogens in dairy wastewater ponds. *Applied and environmental microbiology* **78**, 8089-8095.

**Dungeni, M., Van der Merwe, R. R. & Momba, M. N. B. (2010).** Abundance of pathogenic bacteria and viral indicators in chlorinated effluents produced by four wastewater treatment plants in the Gauteng Province, South Africa. *Water SA* **36**, 607-614.

**Duprè, I., Zanetti, S., Schito, A. M., Fadda, G. & Sechi, L. A. (2003).** Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *Journal of medical microbiology* **52**, 491-498.

## - E -

**Edmond, M. B., Wallace, S. E., McClish, D. K., Pfaller, M. A., Jones, R. N. & Wenzel, R. P. (1999).** Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clinical Infectious Diseases* **29**, 239-244.

**Edrington, T. S., Callaway, T. R., Ives, S. E., Engler, M. J., Looper, M. L., Anderson, R. C. & Nisbet, D. J. (2006).** Seasonal shedding of *Escherichia coli* O157: H7 in ruminants: a new hypothesis. *Foodborne Pathogens & Disease* **3**, 413-421.

**EFSA (2011).** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks 2009. *EFSA Journal* **9**.

**El Marrakchi, A., Boum'handi, N. & Hamama, A. (2005).** Performance of a new chromogenic plating medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from marine environments. *Letters in Applied Microbiology* **40**, 87-91.

**Entry, J. A., Bjorneberg, D. L. & Verwey, S. (2010).** Influence of tillage and daily manure application on the survival of bacterial pathogens indicators in soil and on radish. *Applied and Environmental Soil Science*.

**Erickson, M. C. (2012).** Internalization of fresh produce by foodborne pathogens. *Annual Review of Food Science and Technology* **3**, 283-310.

**Essington, M. E. (2003).** *Soil and water chemistry: An integrative approach*: CRC press.

**Esteban, J., Oporto, B., Aduriz, G., Juste, R. & Hurtado, A. (2009).** Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. *BMC Veterinary Research* **5**, 2.

## - F -

**Farber, J. M. & Peterkin, P. I. (1991).** *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* **55**, 476-511.

**Farrow, J. A. E., Jones, D., Phillips, B. A. & Collins, M. D. (1983).** Taxonomic studies on some group D streptococci. *Journal of General Microbiology* **129**, 1423-1432.

**Fenlon, D. R. (1999).** *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, pp. 21-37. Edited by E. Ryser & E. Marth. New York: Dekker Marcel.

**Fenlon, D. R., Ogden, I. D., Vinten, A. & Svoboda, I. (2000).** The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 149S-156S.

**Ferens, W. A. & Hovde, C. J. (2011).** *Escherichia coli* O157: H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne pathogens and disease* **8**, 465-487.

**Ferguson, D. M., Moore, D. F., Getrich, M. A. & Zhouandai, M. H. (2005).** Enumeration and speciation of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 598-608.

**Fernandez-Alvarez, R. M., Carballo-Cuervo, S., La Rosa-Jorge, D., Carmen, M. & Lecea, J. R.-d. (1991).** The influence of agricultural run-off on bacterial populations in a river. *Journal of Applied Microbiology* **70**, 437-442.

**Fierer, N. & Jackson, R. B. (2006).** The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 626-631.

**Fierer, N., Breitbart, M., Nulton, J., Salamon, P., Lozupone, C., Jones, R., Robeson, M., Edwards, R. A., Felts, B. & Rayhawk, S. (2007).** Metagenomic and small-subunit rRNA analyses



reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Applied and environmental microbiology* **73**, 7059-7066.

**Fisher, K. & Phillips, C. (2009).** The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* **155**, 1749-1757.

**Flahaut, S., Frere, J., Boutibonnes, P. & Auffray, Y. (1996).** Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Applied and environmental microbiology* **62**, 2416-2420.

**Flahaut, S., Laplace, J. M., Frere, J. & Auffray, Y. (1998).** The oxidative stress response in *Enterococcus faecalis*: relationship between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress proteins. *Letters in applied microbiology* **26**, 259-264.

**Foster, R. C. (1988).** Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils* **6**, 189-203.

**Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. & De Vuyst, L. (2006).** The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* **106**, 1-24.

**Frahm, E. & Obst, U. (2003).** Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *Journal of microbiological methods* **52**, 123-131.

**Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H. & Stiles, M. E. (1999).** Enterococci at the crossroads of food safety? *International journal of food microbiology* **47**, 1-24.

**Franz, C. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H. & Holzapfel, W. H. (2003).** Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *International journal of food microbiology* **88**, 105-122.

**Franz, E., Semenov, A. V., Termorshuizen, A. J., de Vos, O. J., Bokhorst, J. G. & van Bruggen, A. H. C. (2008).** Manure-amended soil characteristics affecting the survival of *E. coli* O157 : H7 in 36 Dutch soils. *Environmental Microbiology* **10**, 313-327.

**Franz, E., van Hoek, A. H. A. M., Bouw, E. & Aarts, H. J. M. (2011).** Variability of *Escherichia coli* O157 strain survival in manure-amended soil in relation to strain origin, virulence profile, and carbon nutrition profile. *Applied and environmental microbiology* **77**, 8088-8096.

**Freitag, N. E., Port, G. C. & Miner, M. D. (2009).** *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 623-628.

**Fujioka, R., Sian-Denton, C., Borja, M., Castro, J. & Morphew, K. (1998).** Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and Enterococci in Guam's streams. *Journal of applied microbiology* **85**, 83S-89S.

- Gagliardi, J. V. & Karns, J. S. (2000).** Leaching of *Escherichia coli* O157 : H7 in diverse soils under various agricultural management practices *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4172-4172.
- Gagliardi, J. V. & Karns, J. S. (2002).** Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on plant roots. *Environmental Microbiology* **4**, 89-96.
- Garcia, R., Baelum, J., Fredslund, L., Santorum, P. & Jacobsen, C. S. (2010).** Influence of temperature and predation on survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and expression of invA in soil and manure-amended soil. *Applied and environmental microbiology* **76**, 5025-5031.
- Garrec, N., Picard-Bonnaud, F. & Pourcher, A. M. (2003).** Occurrence of *Listeria* sp and *L. monocytogenes* in sewage sludge used for land application: effect of dewatering, liming and storage tank on survival of *Listeria* species. *Fems Immunology and Medical Microbiology* **35**, 275-283.
- Gaul, L. K., Farag, N. H., Shim, T., Kingsley, M. A., Silk, B. J. & Hyytia-Trees, E. (2013).** Hospital-acquired Listeriosis outbreak caused by contaminated diced celery - Texas, 2010. *Clinical Infectious Diseases* **56**, 20-26.
- Gessel, P. D., Hansen, N. C., Goyal, S. M., Johnston, L. J. & Webb, J. (2004).** Persistence of zoonotic pathogens in surface soil treated with different rates of liquid pig manure. *Applied Soil Ecology* **25**, 237-243.
- Gilbert, R. A., Tomkins, N., Padmanabha, J., Gough, J. M., Krause, D. O. & McSweeney, C. S. (2005).** Effect of finishing diets on *Escherichia coli* populations and prevalence of enterohaemorrhagic *E. coli* virulence genes in cattle faeces. *Journal of applied microbiology* **99**, 885-894.
- Gin, K. Y.-H. & Goh, S. G. (2013).** Modeling the Effect of Light and Salinity on Viable but Non-Culturable (VBNC) *Enterococcus*. *Water research*.
- Giraffa, G. (2002).** Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews* **26**, 163-171.
- Girardin, H., Morris, C. E., Albagnac, C., Dreux, N., Glaux, C. & Nguyen-The, C. (2005).** Behaviour of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments. *FEMS Microbiology Ecology* **54**, 287-295.
- Girvan, M. S., Bullimore, J., Pretty, J. N., Osborn, A. M. & Ball, A. S. (2003).** Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1800-1809.
- Gobat, J.-M., Aragno, M. & Matthey, W. (2010).** *Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols*: PPUR Presses polytechniques.
- Goss, M. J., Barry, D. A. J. & Rudolph, D. L. (1998).** Contamination in Ontario farmstead domestic wells and its association with agriculture: 1. Results from drinking water wells. *Journal of Contaminant Hydrology* **32**, 267-293.

- Goulet, V., Leclercq, A., Laurent, É., King, L., Chenal-Francisque, V., Vaillant, V., Letort, M.-J., Lecuit, M. & de Valk, H. (2012).** Surveillance de la listériose humaine en France, 1999-2011. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* no 50 / Spécial Risques alimentaires microbiologiques
- Granum, P. E. (2005).** *Bacillus cereus*. In *Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology*. Edited by P. M. Fratamico, A. K. Bhunia & S. J. L.
- Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., Orsi, R. H., Fortes, E. D., Milillo, S. R. & Den Bakker, H. C. (2010).** *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **60**, 1280-1288.
- Gray, M. L., A. H. Killinger (1966).** *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *BacteriologyReviews* **30**, 309-382.
- Grif, K., Patscheider, G., Dierich, M. P. & Allerberger, F. (2003).** Incidence of fecal carriage of *Listeria monocytogenes* in three healthy volunteers: A one-year prospective stool survey. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **22**, 16-20.
- Griffin, D. M. (1981).** Water potential as a selective factor in the microbial ecology of soils. *Water potential relations in soil microbiology*, 141-151.
- Grimont, P. A. D. (1987).** Taxonomie des *Escherichia*. *Médecine et maladies infectieuses* **17**, 6-10.
- Grimont, P. A. D., Grimont, F. & Bouvet, P. (2000).** Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In *Salmonella in domestic animals*, pp. 1-17. Edited by C. a. W. Wray, A. . Wallingford CABI Publishing.
- Grimont, P. A. D. & Weill, F. X. (2007).** Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*: Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherche sur les Salmonella
- Grolleau, E., L. Bargeot, A. Chafchafi, R. Hardy, J. Doux, A. Beaudou, H. Le Martret, J. C. Lacassin, J. L. Fort, P. Falipou and D. Arrouays (2004).** Le système d'information national sur les sols : DONESOL et les outils associés. *Étude et Gestion des Sols* **11**, 255-269.
- Grundmann, G. L. (2004).** Spatial scales of soil bacterial diversity - the size of a clone. *FEMS microbiology ecology* **48**, 119-127.
- Guber, A. K., Shelton, D. R. & Pachepsky, Y. A. (2005).** Transport and retention of manure-borne coliforms in soil. *Vadose Zone Journal* **4**, 828-837.
- Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S. & Loessner, M. J. (2009).** Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied and environmental microbiology* **75**, 93-100.

**Guerin, M. T., Martin, S. W., Darlington, G. A. & Rajic, A. (2005).** A temporal study of *Salmonella* serovars in animals in Alberta between 1990 and 2001. *Canadian journal of veterinary research* **69**, 88.

**Guo, X., Chen, J., Brackett, R. E. & Beuchat, L. R. (2001).** Survival of *salmonellae* on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 4760-4764.

**Guo, X., van Iersel, M. W., Chen, J., Brackett, R. E. & Beuchat, L. R. (2002).** Evidence of association of *salmonellae* with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3639-3643.

**Gyles, C. L. (2007).** Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Journal of Animal Science* **85**, E45-E62.

## - H -

**Habteselassie, M., Bischoff, M., Blume, E., Applegate, B., Reuhs, B., Brouder, S. & Turco, R. F. (2008).** Environmental controls on the fate of *Escherichia coli* in soil. *Water, Air, and Soil Pollution* **190**, 143-155.

**Hardina, C. M. & Fujioka, R. S. (1991).** Soil: The environmental source of *Escherichia coli* and *enterococci* in Hawaii's streams. *Environmental Toxicology and Water Quality* **6**, 185-195.

**Hartman, W. H., Richardson, C. J., Vilgalys, R. & Bruland, G. L. (2008).** Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 17842-17847.

**Harwood, V. J., Delahoya, N. C., Ulrich, R. M., Kramer, M. F., Whitlock, J. E., Garey, J. R. & Lim, D. V. (2004).** Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources. *Letters in Applied Microbiology* **38**, 476-482.

**Hattori, T., Hattori, R. & McLaren, A. D. (1976).** The physical environment in soil microbiology: an attempt to extend principles of microbiology to soil microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology* **4**, 423-461.

**Hattori, T. (1988).** Soil aggregates as microhabitats of microorganisms. *Reports of the Institute for Agricultural Research-Tohoku University*.

**Hegstad, K., Mikalsen, T., Coque, T. M., Werner, G. & Sundsfjord, A. (2010).** Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection* **16**, 541-554.

**Hein, I., Krismer, H., Rieck, P. & Wagner, M. (2002).** The use of real-time PCR for rapid detection of *L. monocytogenes* in milk and dairy products. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* **89**, 312-318.

**Hénin, S. (1976).** Cours de physique du sol: texture-structure-aération.

**Hirneisen, K. A., Sharma, M. & Kniel, K. E. (2012).** Human enteric pathogen internalization by root uptake into food crops. *Foodborne pathogens and disease* **9**, 396-405.

**Hitchins, A. D. (2003).** Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. *US Food and Drug Administration's Bacteriological Analytical Manual Chapter 10* [on line] Available in <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>.

**Hof, H. & Hefner, P. (1988).** Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* species. *Infection* **16**, S141-S144.

**Holley, R. A., Arrus, K. M., Ominski, K. H., Tenuta, M. & Blank, G. (2006).** *Salmonella* survival in manure-treated soils during simulated seasonal temperature exposure. *Journal of environmental quality* **35**, 1170-1180.

**Hölzel, C. S., Schwaiger, K., Harms, K., Küchenhoff, H., Kunz, A., Meyer, K., Müller, C. & Bauer, J. (2010).** Sewage sludge and liquid pig manure as possible sources of antibiotic resistant bacteria. *Environmental Research* **110**, 318-326.

**HPA (2011).** *Enterococcus* spp. bacteraemia reports for England, Wales and Northern Ireland: 2006-2010 In *Health Protection Agency* Edited by A. f. [www.hpa.org.uk](http://www.hpa.org.uk).

**Hutchison, M. L., Walters, L. D., Avery, S. M., Synge, B. A. & Moore, A. (2004a).** Levels of zoonotic agents in British livestock manures. *Letters in Applied Microbiology* **39**, 207-214.

**Hutchison, M. L., Walters, L. D., Moore, A., Crookes, K. M. & Avery, S. M. (2004b).** Effect of length of time before incorporation on survival of pathogenic bacteria present in livestock wastes applied to agricultural soil. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 5111-5118.

**Hutchison, M. L., Walters, L. D., Avery, S. M., Munro, F. & Moore, A. (2005).** Analyses of livestock production, waste storage, and pathogen levels and prevalences in farm manures. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 1231-1236.

## - I -

**Ibekwe, A. M., Watt, P. M., Grieve, C. M., Sharma, V. K. & Lyons, S. R. (2002).** Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157: H7 in dairy wastewater wetlands. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4853-4862.

**Ibekwe, A. M., Shouse, P. J. & Grieve, C. M. (2006).** Quantification of survival of *Escherichia coli* O157: H7 on plants affected by contaminated irrigation water. *Engineering in life sciences* **6**, 566-572.

**Ibekwe, A. M., Papiernik, S. K., Grieve, C. M. & Yang, C. H. (2010).** Influence of fumigants on soil microbial diversity and survival of *E. coli* O157: H7. *Journal of Environmental Science and Health Part B* **45**, 416-426.

**Islam, Mahbub, Doyle, Michael, P., Phatak, Sharad, C., Millner, Patricia & Xiuping, J. (2004a).** Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley

*grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water.* Des Moines, IA, ETATS-UNIS: International Association for Food Protection.

**Islam, Mahbub, Doyle, Michael, P., Phatak, Sharad, C., Millner, Patricia & Xiuping, J. (2005).** *Survival of Escherichia coli O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water.* Kidlington, ROYAUME-UNI: Elsevier.

**Islam, M., Morgan, J., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P. & Jiang, X. (2004b).** Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or Irrigation water. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 2497-2502.

**ISO 10381-1 (2002).** Soil quality - Sampling - Part 1: Guidance on the design of sampling programmes

**ISO (1996).** Microbiology of food and animal feeding stuffs ó Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* ó Part 1: Detection method. *International Standard ISO 11290-1 International Organization for Standardization Geneva, Switzerland.*

## - J -

**Jablasone, J., Warriner, K. & Griffiths, M. (2005).** Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. *International Journal of Food Microbiology* **99**, 7-18.

**Jacobsen, C. S. & Bech, T. B. (2012).** Soil survival of *Salmonella* and transfer to freshwater and fresh produce. *Food Research International* **45**, 557-566.

**Jacquet, C., Catimel, B., Brosch, R., Buchrieser, C., Dehaumont, P., Goulet, V., Lepoutre, A., Veit, P. & Rocourt, J. (1995).** Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2242-2246.

**Jaffrezic, A., Jardé, E., Pourcher, A.-M., Gourmelon, M., Caprais, M.-P., Heddadj, D., Cottinet, P., Bilal, M., Derrien, M. & Marti, R. (2011).** Microbial and chemical markers: runoff transfer in animal manure-amended soils. *Journal of Environmental Quality* **40**, 959-968.

**Jamieson, R. C., Gordon, R. J., Sharples, K. E., Stratton, G. W. & Madani, A. (2002).** Movement and persistence of faecal bacteria in agricultural soils and subsurface water: A review. *Canadian biosystems engineering* **44**.

**Janzten, M. M., Navas, J., Corujo, A., Moreno, R., Lopez, V. & Martinez-Suarez, J. V. (2006).** Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. *Spanish Journal of Agricultural Research* **4**, 235-247.

**Jawson, M. D., Elliott, L. F., Saxton, K. E. & Fortier, D. H. (1982).** The effect of cattle grazing on indicator bacteria in runoff from a Pacific Northwest watershed. *Journal of Environmental Quality* **11**, 621-627.

**Jett, B. D., Huycke, M. M. & Gilmore, M. S. (1994).** Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* **7**, 462-478.

**Jeyaletchumi, P., Tunung, R., Selina, P. M., Chai, L. C., Radu, S., Farinazleen, M. G., Cheah, Y. K., Mitsuaki, N., Yoshitsugu, N. & Kumar, M. P. (2011).** Evaluation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in selected vegetable farms. *J Trop Agric and Fd Sc* **39**, 255-266.

**Jiang, X. P., Morgan, J. & Doyle, M. P. (2002).** Fate of *Escherichia coli* O157 : H7 in manure-amended soil. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2605-2609.

**Jiménez, M., Martínez-Urtaza, J. & Chaidez, C. (2011).** Geographical and temporal dissemination of *salmonellae* isolated from domestic animal hosts in the Culiacan Valley, Mexico. *Microbial ecology* **61**, 811-820.

**Johnsen, G., Wasteson, Y., Heir, E., Berget, O. I. & Herikstad, H. (2001).** *Escherichia coli* O157: H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999. *International journal of food microbiology* **65**, 193-200.

**Jolivet, C., D. Arrouays, L. Boulonne, C. Ratié and S. Saby (2006).** Le Réseau de mesures de la Qualité des sols de France (RMQS) Etat d'avancement et premiers résultats. *étude et Gestion des Sols* **13**, 149-164.

**Jones, D. L. (1999).** Potential health risks associated with the persistence of *Escherichia coli* O157 in agricultural environments. *Soil Use and Management* **15**, 76-83.

**Jourdan-Da Silva, N. & Le Hello, S. (2010).** Salmonelloses en France, 2002-2010 : tendances en épidémiologie humaine, émergence de la souche monophasique, principaux aliments impliqués dans les dernières épidémies. In *Bulletin épidémiologique - santé animale-alimentation*, pp. 31-35.

## - K -

**Kibbey, H. J., Hagedorn, C. & McCoy, E. L. (1978).** Use of fecal Streptococci as indicators of pollution in soil. *Applied and environmental microbiology* **35**, 711-717.

**Kilbertus, G. (1980).** Etude des microhabitats contenus dans les agrégats du sol. Leur relation avec la biomasse bactérienne et la taille des procaryotes présents. *Rev Ecol Biol Sol* **17**, 543-557.

**Killham, K. (1994).** *Soil ecology*: Cambridge University Press.

**Klein, M., Brown, L., Tucker, R. W., Ashbolt, N. J., Stuetz, R. M. & Roser, D. J. (2010a).** Diversity and abundance of zoonotic pathogens and indicators in manures of feedlot cattle in australia. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 6947-6950.

**Klein, M., Brown, L., van den Akker, B., Peters, G. M., Stuetz, R. M. & Roser, D. J. (2010b).** Monitoring bacterial indicators and pathogens in cattle feedlot waste by real-time PCR. *Water research* **44**, 1381-1388.

**Klerks, M. M., Franz, E., van Gent-Pelzer, M., Zijlstra, C. & van Bruggen, A. H. C. (2007).** Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. *ISME J* **1**, 620-631.

**Koo, K. & Jaykus, L.-A. (2003).** Detection of *Listeria monocytogenes* from a model food by fluorescence resonance energy transfer-based PCR with an asymmetric fluorogenic probe set. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1082-1088.

**Korsak, N., Clinquart, A. & G., D. (2004).** *Salmonella* spp. dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique ? *Annales de Médecine Vétérinaire* **148**, 174-193.

**Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D. & Sela, S. (2009).** Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Applied and environmental microbiology* **75**, 6076-6086.

**Kühn, I., Iversen, A., Burman, L. G., Olsson-Liljequist, B., Franklin, A., Finn, M., Aarestrup, F., Seyfarth, A. M., Blanch, A. R. & Vilanova, X. (2003).** Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment - a European study. *International journal of food microbiology* **88**, 133-145.

**Kutter, Stefan, Hartmann, Anton, Schmid & Michael (2006).** *Colonization of barley (Hordeum vulgare) with Salmonella enterica and Listeria spp.* Oxford, ROYAUME-UNI: Blackwell.

## - L -

**La Ragione, R. M., Best, A., Woodward, M. J. & Wales, A. D. (2009).** *Escherichia coli* O157: H7 colonization in small domestic ruminants. *FEMS microbiology reviews* **33**, 394-410.

**Lau, M. M. & Ingham, S. C. (2001).** Survival of faecal indicator bacteria in bovine manure incorporated into soil. *Letters in Applied Microbiology* **33**, 131-136.

**Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R. & Fierer, N. (2009).** Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 5111-5120.

**Lavelle, P. & Spain, A. V. (2001).** *Soil ecology*: Springer.

**Leclerc, H., Devriese, L. A. & Mossel, D. A. A. (1996).** Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *Journal of Applied Microbiology* **81**, 459-466.

**Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A. D., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S. M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A. & Lecuit, M. (2010).** *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **60**, 2210-2214.

**Lee, Dae, Y., Shannon, Kelly, Beaudette & Lee, A. (2006).** *Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR.* Amsterdam, PAYS-BAS: Elsevier.



**Lemunier, M., Francou, C., Rousseaux, S., Houot, S., Dantigny, C., Piveteau, P. & Guzzo, J. (2005).** Long-term survival of pathogenic and sanitation indicator bacteria in experimental biowaste composts. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 5779-5786.

**Lepeuple, A. S., Gaval, G., Jovic, M. & de Roubin, M. R. (2004).** Literature review on levels of pathogens and their abatement in sludges, soil and treated biowaste. *Desk study report HORIZONTAL-6, WP3: Hygienic parameters.*

**Lindbäck, T., Rottenberg, M. E., Roche, S. M. & Rorvik, L. M. (2010).** The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Veterinary research* **41**, 1-10.

**Liu, D. (2006).** Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology* **55**, 645-659.

**Lleo, M., Tafi, M. C., Signoretto, C., Cero, C. & Canepari, P. (1999).** Competitive polymerase chain reaction for quantification of nonculturable *Enterococcus faecalis* cells in lake water. *FEMS microbiology ecology* **30**, 345-353.

**Locatelli, A., Depret, G., Jolivet, C., Henry, S., Dequiedt, S., Piveteau, P. & Hartmann, A. (2013a).** Nation-wide study of the occurrence of *Listeria monocytogenes* in French soils using culture-based and molecular detection methods. *Journal of microbiological methods*.

**Locatelli, A., Spor, A., Jolivet, C., Piveteau, P. & Hartmann, A. (2013b).** Biotic and abiotic soil properties influence survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *PLoS ONE* **8**, e75969.

**Low, J. C. & Donachie, W. (1997).** A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J* **153**, 9 - 29.

**Ly, T. M. C. & Müller, H. E. (1990).** Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *Journal of medical microbiology* **33**, 51-54.

**Lyautey, E., Lapen, D. R., Wilkes, G., McCleary, K., Pagotto, F., Tyler, K., Hartmann, A., Piveteau, P., Rieu, A. I., Robertson, W. J., Medeiros, D. T., Edge, T. A., Gannon, V. & Topp, E. (2007).** Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the south nation river watershed, Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 5401-5410.

**Lyautey, E., Hartmann, A., Lapen, D. R. & Topp, E. (2012).** A comparison of enrichment and direct-plating methods for isolation of *Listeria monocytogenes* from surface water. *Canadian journal of microbiology* **58**, 1405-1410.

## - M -

- MacGowan, A. P., Bowker, K., McLauchlin, J., Bennett, P. M. & Reeves, D. S. (1994).** The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. *International Journal of Food Microbiology* **21**, 325-334.
- Mallmann, W. L. & Litsky, W. (1951).** Survival of selected enteric organisms in various types of soil. *American Journal of Public Health and the Nations Health* **41**, 38-44.
- Marschner, P., Yang, C. H., Lieberei, R. & Crowley, D. E. (2001).** Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 1437-1445.
- Matos, A., Kerkhof, L. & Garland, J. L. (2005).** Effects of microbial community diversity on the survival of *Pseudomonas aeruginosa* in the wheat rhizosphere. *Microbial ecology* **49**, 257-264.
- Mawdsley, J. L., Bardgett, R. D., Merry, R. J., Pain, B. F. & Theodorou, M. K. (1995).** Pathogens in livestock waste, their potential for movement through soil and environmental pollution. *Applied Soil Ecology* **2**, 1-15.
- McLaughlin, H., Casey, P., Cotter, J., Gahan, C. & Hill, C. (2011).** Factors affecting survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in soil samples. *Archives of Microbiology* **193**, 775-785.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. & Tauxe, R. V. (1999).** Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases* **5**, 607-625.
- Mead, P. S., Dunne, E. F., Graves, L., Wiedmann, M., Patrick, M., Hunter, S., Salehi, E., Mostashari, F., Craig, A., Mshar, P., Bannerman, T., Sauders, B. D., Hayes, P., Dewitt, W., Sparling, P., Griffin, P., Morse, D., Slutsker, L. & Swaminathan, B. (2006).** Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiology and Infection* **134**, 744-751.
- Meng, J. & Doyle, M. P. (1998).** Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. *Bulletin de l'Institut Pasteur* **96**, 151-163.
- Micallef, S. A., Rosenberg Goldstein, R. E., George, A., Ewing, L., Tall, B. D., Boyer, M. S., Joseph, S. W. & Sapkota, A. R. (2012).** Diversity, distribution and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. recovered from tomatoes, leaves, water and soil on US mid-atlantic farms. *Food Microbiology*.
- Monaghan, J. M. & Hutchison, M. L. (2012).** Distribution and decline of human pathogenic bacteria in soil after application in irrigation water and the potential for soil-splash-mediated dispersal onto fresh produce. *Journal of Applied Microbiology* **112**, 1007-1019.
- Mondragon, V. A., Llamas-Pérez, D. F., Gonzalez-Guzman, G. E., Marquez-Gonzalez, A. R., Padilla-Noriega, R., de Jesus Duran-Avelar, M. & Franco, B. (2011).** Identification of *Enterococcus faecalis* bacteria resistant to heavy metals and antibiotics in surface waters of the Mololoa River in Tepic, Nayarit, Mexico. *Environmental monitoring and assessment* **183**, 329-340.
- Morrison, D., Woodford, N. & Cookson, B. (1997).** Enterococci as emerging pathogens of humans. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 89S-99S.

**Mubiru, D. N., Coyne, M. S. & Grove, J. H. (2000).** Mortality of *Escherichia coli* O157 : H7 in two soils with different physical and chemical properties. *Journal of Environmental Quality* **29**, 1821-1825.

**Müller, H. E. (1990).** Listeria isolations from feces of patients with diarrhea and from healthy food handlers. *Infection* **18**, 97-100.

**Müller, T., Ulrich, A., Ott, E.-M. & Müller, M. (2001).** Identification of plant-associated enterococci. *Journal of applied microbiology* **91**, 268-278.

**Mundt, J. O. (1961).** Occurrence of Enterococci: bud, blossom, and soil studies. *Applied microbiology* **9**, 541-544.

**Murray, B. E. (1990).** The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical microbiology reviews* **3**, 46-65.

**Musy, A. & Soutter, M. (1991).** *Physique du sol*. Lausanne: PPUR presses polytechniques.

## - N -

**Natvig, E. E., Ingham, S. C., Ingham, B. H., Cooperband, L. R. & Roper, T. R. (2002).** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2737-2744.

**NF ISO 10381-6 (2009).** Soil quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory.

**Nicholson, F. A., Groves, S. J. & Chambers, B. J. (2005).** Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology* **96**, 135-143.

**Nightingale, K. K., Schukken, Y. H., Nightingale, C. R., Fortes, E. D., Ho, A. J., Her, Z., Grohn, Y. T., McDonough, P. L. & Wiedmann, M. (2004).** Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 4458-4467.

**Noble, C. J. (1978).** Carriage of group D streptococci in the human bowel. *Journal of clinical pathology* **31**, 1182-1186.

**Noble, R. T., Griffith, J. F., Blackwood, A. D., Fuhrman, J. A., Gregory, J. B., Hernandez, X., Liang, X., Bera, A. A. & Schiff, K. (2006).** Multitiered approach using quantitative PCR to track sources of fecal pollution affecting Santa Monica Bay, California. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 1604-1612.

**Nogva, H. K., Rudi, K., Naterstad, K., Holck, A. & Lillehaug, D. (2000).** Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4266-4271.

**Nsabimana, D., Haynes, R. J. & Wallis, F. M. (2004).** Size, activity and catabolic diversity of the soil microbial biomass as affected by land use. *Applied Soil Ecology* **26**, 81-92.

**Nyberg, K. A., Vinneras, B., Ottoson, J. R., Aronsson, P. & Albiñ, A. (2010).** Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium in manure-amended soils studied in outdoor lysimeters. *Applied Soil Ecology* **46**, 398-404.

## - O -

**O'Connor, D. R. (2002).** Part one: a summary: report of the Walkerton Inquiry: the events of May 2000 and related issues.

**Ogden, I. D., Fenlon, D. R., Vinten, A. J. A. & Lewis, D. (2001).** The fate of *Escherichia coli* O157 in soil and its potential to contaminate drinking water. *International Journal of Food Microbiology* **66**, 111-117.

**Oliver, D. M., Haygarth, P. M., Clegg, C. D. & Heathwaite, L. (2006).** Differential *E. coli* die-off patterns associated with agricultural matrices. *Environmental Science & Technology* **40**, 5710-5716.

**Oliver, H. F., Wiedmann, M. & J., B. K. (2007).** Environmental reservoir and transmission into the mammalian host. In *Listeria monocytogenes : Pathogenesis and Host Response*, pp. pp 111-137 Edited by H. Goldfine & H. Shen: Springer.

**Olsen, S. J., Bishop, R., Brenner, F. W., Roels, T. H., Bean, N., Tauxe, R. V. & Slutsker, L. (2001).** The changing epidemiology of *Salmonella*: Trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. *Journal of Infectious Diseases* **183**, 753-761.

**Ongeng, D., Muyanja, C., Geeraerd, A. H., Springael, D. & Ryckeboer, J. (2011a).** Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in manure and manure-amended soil under tropical climatic conditions in Sub-Saharan Africa. *Journal of Applied Microbiology* **110**, 1007-1022.

**Ongeng, D., Vasquez, G. A., Muyanja, C., Ryckeboer, J., Geeraerd, A. H. & Springael, D. (2011b).** Transfer and internalisation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in cabbage cultivated on contaminated manure-amended soil under tropical field conditions in Sub-Saharan Africa. *International Journal of Food Microbiology* **145**, 301-310.

## - P -

**Paillard, D., Dubois, V., Thiebaut, R., Nathier, F., Hoogland, E., Caumette, P. & Quentin, C. (2005).** Occurrence of *Listeria* spp. in effluents of french urban wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 7562-7566.

**Paniel, N., Rousseaux, S., Gourland, P., Poitrenaud, M. & Guzzo, J. (2010).** Assessment of survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Infantis* and *Enterococcus faecalis* artificially inoculated into experimental waste or compost. *Journal of applied microbiology* **108**, 1797-1809.

**Patni, N. K., Toxopeus, H. R. & Jui, P. Y. (1985).** Bacterial quality of runoff from manured and non-manured cropland. *Transactions of American Society of Agricultural Engineers* **28**, 1871-1877.

**Peres-Neto, P. R., Legendre, P., Dray, S. p. & Borcard, D. (2006).** Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology* **87**, 2614-2625.

## - R -

**Ran, Q., Badgley, B. D., Dillon, N., Dunny, G. M. & Sadowsky, M. J. (2013).** Occurrence, genetic diversity, and persistence of Enterococci in a lake superior watershed. *Applied and Environmental Microbiology*.

**Ranjard, L., Richaume, A., Jocteur-Monrozier, L. & Nazaret, S. (1997).** Response of soil bacteria to Hg (II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS microbiology ecology* **24**, 321-331.

**Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, J., Richaume, A., Gourbiere, F., Thioulouse, J. & Nazaret, S. (2000).** Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microbial Ecology* **39**, 263-272.

**Ranjard, L. & Richaume, A. s. (2001).** Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology* **152**, 707-716.

**Ranjard, L., Lejon, D. P. H., Mougél, C., Schehrer, L., Merdinoglu, D. & Chaussod, R. (2003).** Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology* **5**, 1111-1120.

**Ranjard, L., Dequiedt, S., Jolivet, C., Saby, N. P. A., Thioulouse, J., Harmand, J., Loisel, P., Rapaport, A., Fall, S., Simonet, P., Joffre, R., Boure, N. C. P., Maron, P. A., Mougél, C., Martin, M. P., Toutain, B., Arrouays, D. & Lemanceau, P. (2009).** Biogeography of soil microbial communities: a review and a description of the ongoing french national initiative. *Agronomy for Sustainable Development* **30**, 359-365.

**Ranjard, L., Dequiedt, S., Prévost-Bouré, N. C., Thioulouse, J., Saby, N. P. A., Lelievre, M., Maron, P. A., Morin, F. E. R., Bispo, A. & Jolivet, C. (2013).** Turnover of soil bacterial diversity driven by wide-scale environmental heterogeneity. *Nature communications* **4**, 1434.

**Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P. & Cocolin, L. (2008).** Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* **121**, 99-105.

**Reddy, K. R., Khaleel, R. & Overcash, M. R. (1981).** Behavior and transport of microbial pathogens and indicator organisms in soils treated with organic wastes. *Journal of Environmental Quality* **10**, 255-266.

**Reeves, M, W., Evins, G, M., Heiba, A, A., Plikaytis, B, D., Farmer & J, J., III (1989).** *Clonal nature of Salmonella typhi and its genetic relatedness to other Salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of Salmonella bongori comb. nov.* Washington, DC, ETATS-UNIS: American Society for Microbiology.

**Rincé, A., Giard, J.-C., Pichereau, V., Flahaut, S. & Auffray, Y. (2001).** Identification and characterization of ogsp65, an organic hydroperoxide resistance (ohr) gene encoding a general stress protein in *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology* **183**, 1482-1488.

**Robert, M. (1996).** *Le Sol: interface dans l'environnement: ressource pour le développement*. Paris.

**Rocourt, J. (1988).** Taxonomy of the genus *Listeria*. *Infection* **16**, S89-S91.

**Rocourt, J. (1999).** The genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes* : Phylogenetic position, taxonomy and identification. In *Listeria, Listeriosis and food safety*, pp. 1-20. Edited by E. T. Ryser & E. H. Marth. New York: Marcel Dekker.

**Rocourt, J., Jacquet, C. & Reilly, A. (2000).** Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology* **62**, 197-209.

**Romdhana, M. H. d., Lecomte, D., Ladevie, B. & Sablayrolles, C. (2009).** Monitoring of pathogenic microorganisms contamination during heat drying process of sewage sludge. *Process Safety and Environmental Protection* **87**, 377-386.

**Rossmannith, P., Krassnig, M., Wagner, M. & Hein, I. (2006).** Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. *Research in Microbiology* **157**, 763-771.

**Rugbjerg, H., Nielsen, E. M. & Andersen, J. S. (2003).** Risk factors associated with faecal shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in eight known-infected Danish dairy herds. *Preventive veterinary medicine* **58**, 101-113.

**Russell, J. B. & Rychlik, J. L. (2001).** Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* **292**, 1119-1122.

**Russo, T. A. & Johnson, J. R. (2000).** Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Journal of Infectious Diseases* **181**, 1753-1754.

**Rutherford, P. M. & Juma, N. G. (1992).** Influence of texture on habitable pore space and bacterial-protozoan populations in soil. *Biology and fertility of soils* **12**, 221-227.

**- S -**

- Saini, R., Halverson, L. J. & Lorimor, J. C. (2003).** Rainfall timing and frequency influence on leaching of RS2G through soil following manure application. *Journal of environmental quality* **32**, 1865-1872.
- Samie, A., Obi, C. L., Igumbor, J. O. & Momba, M. N. B. (2009).** Focus on 14 sewage treatment plants in the Mpumalanga Province, South Africa in order to gauge the efficiency of wastewater treatment. *African Journal of Biotechnology* **8**.
- Santo Domingo, J. W., Siefring, S. C. & Haugland, R. A. (2003).** Real-time PCR method to detect *Enterococcus faecalis* in water. *Biotechnology letters* **25**, 261-265.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., Jones, J. L. & Griffin, P. M. (2011).** Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerging infectious diseases* **17**, 7.
- Scherer, C. A. & Miller, S. I. (2001).** Molecular pathogenesis of salmonellae. In *Principles of bacterial pathogenesis*, pp. 265-333. Edited by E. A. Groisman. San Diego, Calif: Academic Press.
- Sedgley, C. M., Nagel, A. C., Shelburne, C. E., Clewell, D. B., Appelbe, O. & Molander, A. (2005).** Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Archives of oral biology* **50**, 575-583.
- Semenov, A. V., van Overbeek, L. & van Bruggen, A. H. C. (2009).** Percolation and survival of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in soil amended with contaminated dairy manure or slurry. *Applied and environmental microbiology* **75**, 3206-3215.
- Sercu, B., Werfhorst, L. C. V. D., Murray, J. & Holden, P. A. (2008).** Storm drains are sources of human fecal pollution during dry weather in three urban southern California watersheds. *Environmental science & technology* **43**, 293-298.
- Shannon, K. E., Lee, D. Y., Trevors, J. T. & Beaudette, L. A. (2007).** Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Science of the total environment* **382**, 121-129.
- Sidorenko, M. L., Buzoleva, L. S. & Kostenkov, N. M. (2006).** The effect of soil properties on the preservation and reproduction of *Listeria* and *Yersinia*. *Eurasian Soil Science* **39**, 211-217.
- Siegman-Igra, Y., Levin, R., Weinberger, M., Golan, Y., Schwartz, D., Samra, Z., Konigsberger, H., Yinnon, A., Rahav, G. & Keller, N. (2002).** *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide. *Emerging infectious diseases* **8**, 305.
- Sim, J., Hood, D., Finnie, L., Wilson, M., Graham, C., Brett, M. & Hudson, J. A. (2002).** Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. *Letters in applied microbiology* **35**, 409-413.
- Sindic, C. (2002).** *Neuro-infectiologie*: Wolters Kluwer France.

**Slutsker, I. & Schuchat, A. (1999).** Listeriosis in Humans. In *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, pp. 75-95. Edited by E. Ryser & E. Marth. New York: Dekker Marcel.

**Smith, L. D. (1978).** The occurrence of *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* in the soil of the United States. *Health laboratory science* **15**, 74.

**Smith, L. D. S. (1979).** *Clostridium botulinum*: Characteristics and occurrence. *Review of Infectious Diseases* **1**, 637-641.

**Solo-Gabriele, H. M., Wolfert, M. A., Desmarais, T. R. & Palmer, C. J. (2000).** Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 230-237.

**Solomon, E. B., Yaron, S. & Matthews, K. R. (2002).** Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 397-400.

**Sullivan, T. S., McBride, M. B. & Thies, J. E. (2013).** Soil bacterial and archaeal community composition reflects high spatial heterogeneity of pH, bioavailable Zn, and Cu in a metalliferous peat soil. *Soil Biology and Biochemistry*.

## - T -

**Tate, R. L. (1978).** Cultural and environmental factors affecting the longevity of *Escherichia coli* in histosols. *Applied and Environmental Microbiology* **35**, 925-929.

**Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B. & Denamur, E. (2010).** The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* **8**, 207-217.

**Tezcan-Merdol, D., Ljungstrom, M., Winiecka-Krusnell, J., Linder, E., Engstrand, L. & Rhen, M. (2004).** Uptake and replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba rhyodes*. *Applied and environmental microbiology* **70**, 3706-3714.

**Thorn, G., Elsas, J. D. v., Trevors, J. T. & Wellington, E. M. H. (1997).** The fungi in soil. *Modern soil microbiology*, 63-127.

**Thurston-Enriquez, J. A., Gilley, J. E. & Eghball, B. (2005).** Microbial quality of runoff following land application of cattle manure and swine slurry. *Biological Systems Engineering: Papers and Publications*, 16.

**Ticknor, L. O., Kolsto, A.-B., Hill, K. K., Keim, P., Laker, M. T., Tonks, M. & Jackson, P. J. (2001).** Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. *Applied and environmental microbiology* **67**, 4863-4873.

**Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M. & Euzéby, J. P. (2005).** Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 521-524.



**Tisdall, J. M. & Oades, J. M. (1982).** Organic matter and water-stable aggregates in soils. *Journal of soil science* **33**, 141-163.

**Torsvik, V., Goksoyr, J. & Daae, F. L. (1990).** High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and environmental microbiology* **56**, 782-787.

**Torsvik, V., Sorheim, R. & Goksoyr, J. (1996).** Total bacterial diversity in soil and sediment communities - a review. *Journal of Industrial Microbiology* **17**, 170-178.

**Toussaint, B. & Dehareng, D.** La gestion des effluents d'élevage. *les livrets de l'agriculture* N°2.

**Toze, S. (1997).** Microbial pathogens in wastewater. *CSIRO Land and Water Technical report 1/97*.

**Tyrrel, S. F. & Quinton, J. N. (2003).** Overland flow transport of pathogens from agricultural land receiving faecal wastes. *Journal of Applied Microbiology* **94**, 87-93.

## **- U -**

**Unc, A. & Goss, M. J. (2003).** Movement of faecal bacteria through the vadose zone. *Water, Air, and Soil Pollution* **149**, 327-337.

**Unc, A. & Goss, M. J. (2006).** Culturable *Escherichia coli* in soil mixed with two types of manure. *Soil Science Society of America Journal* **70**, 763-769.

**USDA (1975).** *Soil Taxonomy: a basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys* Washington DC.

**USDA (2002a).** Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples. *Microbiology Laboratory Guidebook [on line]* Available in <http://wwwfsis.usdagov/OPHS/microlab/mlgbookhtm>.

**USEPA (2004).** Water quality standards for coastal and great Lakes recreation waters. *Environmental Protection Agency*, 67218-67243.

## **- V -**

**Valenzuela, A. S., Benomar, N., Abriouel, H., Pulido, R. P., Canamero, M. M. & Galvez, A. (2012).** Characterization of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from wild flowers. *Antonie van Leeuwenhoek* **101**, 701-711.

**van Bruggen, A. H. C., Semenov, A. M., van Diepeningen, A. D., de Vos, O. J. & Blok, W. J. (2006).** Relation between soil health, wave-like fluctuations in microbial populations, and soil-borne plant disease management. *European journal of plant pathology* **115**, 105-122.

**Van Donsel, D. J., Geldreich, E. E. & Clarke, N. A. (1967).** Seasonal variations in survival of indicator bacteria in soil and their contribution to storm-water pollution. *Applied Microbiology* **15**, 1362-1370.

**van Elsas, J. D., Hill, P., Chronakova, A., Grekova, M., Topalova, Y., Elhottova, D. & Kristufek, V. (2007).** Survival of genetically marked *Escherichia coli* O157:H7 in soil as affected by soil microbial community shifts. *ISME J* **1**, 204-214.

**van Elsas, J. D., Chiurazzi, M., Mallon, C. A., Elhottova, D., Kristufek, V. c. & Salles, J. F. o. (2012).** Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 1159-1164.

**Vanrenterghem, B., Huysman, F., Rygole, R. & Verstraete, W. (1991).** Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. *Journal of Applied Bacteriology* **71**, 211-217.

**Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. & Kreft, J. (2001).** *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews* **14**, 584-640.

**Velge, P., Cloeckaert, A. & Barrow, P. (2005).** Emergence of *Salmonella* epidemics : The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Veterinary Research* **36**, 267-288.

**Vivant, A.-L., Garmyn, D., Maron, P.-A., Nowak, V. & Piveteau, P. (2013).** Microbial diversity and structure are drivers of the biological barrier effect against *Listeria monocytogenes* in soil. *PLoS ONE* **8**, e76991.

## - W -

**Wallenius, K., Rita, H., Mikkonen, A., Lappi, K., Lindstrom, K., Hartikainen, H., Raateland, A. & Niemi, R. M. (2011).** Effects of land use on the level, variation and spatial structure of soil enzyme activities and bacterial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **43**, 1464-1473.

**Weis, J. & Seeliger, H. P. R. (1975).** Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Applied Microbiology* **30**, 29-32.

**Weiser, R. S. & Osterud, C. M. (1945).** Studies on the death of bacteria at low temperatures I. The influence of the intensity of the freezing temperature, repeated fluctuations of temperature, and the period of exposure to freezing temperatures on the mortality of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **50**, 413-439.

**Welshimer, H. J. (1960).** Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *Journal of Bacteriology* **80**, 316-320.

**Welshimer, H. J. (1968).** Isolation of *Listeria monocytogenes* from Vegetation. *Journal of Bacteriology* **95**, 300-303.

**Welshimer, H. J. & Donker-Voet, J. (1971).** *Listeria monocytogenes* in Nature. *Applied Microbiology* **21**, 516-519.

**Welshimer, H. J. (1975).** *Listeria* in nature. *Problems of listeriosis*, 59-60.

**Wesley, I. (1999).** Listeriosis in animals. In *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, pp. 39-73. Edited by E. Ryser & E. Marth. New York: Dekker Marcel.

**Wheeler, A. L., Hartel, P. G., Godfrey, D. G., Hill, J. L. & Segars, W. I. (2002).** Potential of as a human fecal indicator for microbial source tracking. *Journal of Environmental Quality* **31**, 1286-1293.

**Williams, A. P., Avery, L. M., Killham, K. & Jones, D. L. (2007).** Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in the rhizosphere of maize grown in waste-amended soil. *Journal of applied microbiology* **102**, 319-326.

**Williamson, K. E., Radosevich, M. & Wommack, K. E. (2005).** Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils. *Applied and environmental microbiology* **71**, 3119-3125.

**Wilson, I. G. (1997).** Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3741-3751.

**Winfield, M. D. & Groisman, E. A. (2003).** Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 3687-3694.

**Wing, E. J. & Gregory, S. H. (2002).** *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *Journal of Infectious Diseases* **185**, S18-S24.

## - Y - Z -

**You, Y., Rankin, S. C., Aceto, H. W., Benson, C. E., Toth, J. D. & Dou, Z. (2006).** Survival of *Salmonella enterica* serovar Newport in manure and manure-amended soils. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 5777-5783.

**Yun, J.-S., Wee, Y.-J. & Ryu, H.-W. (2003).** Production of optically pure l (+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enzyme and microbial technology* **33**, 416-423.

**Zhai, Q., Coyne, M. S. & Barnhisel, R. I. (1995).** Mortality rates of fecal bacteria in subsoil amended with poultry manure. *Bioresource Technology* **54**, 165-169.

**Résumé :** Certaines pratiques agricoles telles que l'épandage de produits résiduels organiques (PRO) ou l'irrigation des sols peuvent être à l'origine de l'introduction de bactéries pathogènes de l'Homme dans les sols. Le sol joue alors un rôle central dans la dissémination de ces bactéries pathogènes dans les différents compartiments de l'environnement et peut contaminer les matières premières végétales, les animaux d'élevage mais également les ressources en eau. Le risque sanitaire associé à la dissémination de ces bactéries pathogènes doit être évalué afin de limiter le développement de maladies infectieuses. Dans ce contexte, l'incidence et le potentiel de survie de bactéries pathogènes a été étudié dans un large ensemble de sols provenant du territoire français (Réseau de Mesure de la Qualité des Sols : RMQS). Ce travail a pour objectif général d'identifier les facteurs biotiques et abiotiques des sols qui déterminent l'incidence et la survie de d'un pathogène strict, *Listeria monocytogenes*, et d'un pathogène opportuniste, *Enterococcus faecalis*, dans ces matrices environnementales. Pour ceci, 2 approches ont été adoptées : la première approche a visé à mettre au point des systèmes de détection de PCR quantitative spécifiques pour ces deux espèces bactériennes afin de détecter et quantifier ces 2 bactéries dans un ensemble de 1200 ADN de sols présentant des paramètres pédoclimatiques contrastés. *L. monocytogenes* n'est pas détectée dans les ADN de sols avec la méthode moléculaire développée, dont le seuil de détection est d'environ  $10^4$  bactéries par gramme de sol. La détection moléculaire d'*E. faecalis* a été biaisée par un problème de contamination des ADN extraits. Après extraction de nouveaux ADN sur 150 échantillons de sol, *E. faecalis* a été détecté en faible quantité dans 5 des 150 sols testés (4% des sols) à des concentrations d'environ  $10^2$  bactéries par gramme de sol. Dans une deuxième approche, la survie de *L. monocytogenes* et d'*E. faecalis* a été suivie dans un ensemble de 100 sols caractérisés par des paramètres pédoclimatiques variables. Des microcosmes de sols ont été inoculés et la survie bactérienne a été évaluée par des méthodes culturales classiques. *L. monocytogenes* survit à long terme dans un plus grand nombre de sols qu'*E. faecalis*. Les sols favorables à la survie à long terme sont majoritairement (44%) les mêmes pour les 2 bactéries. Les sols sableux présentant un pH acide sont défavorables à la survie des 2 bactéries. Cependant des différences sont observées quant aux paramètres physico-chimiques des sols qui déterminent la survie de ces 2 bactéries. Ainsi, la survie de *L. monocytogenes* est corrélée positivement au taux de saturation en cations basiques, à la capacité d'échange cationique et à la concentration en calcium pour le court terme et à la teneur en argile pour le long terme. En revanche, pour *E. faecalis*, une corrélation négative avec la teneur en calcium total est trouvée pour la survie à court terme alors que la survie à long terme est négativement corrélée à la concentration en phosphore assimilable. Un effet inhibiteur de la microflore des sols a été mis en évidence sur la survie de *L. monocytogenes* et *E. faecalis* : il est statistiquement significatif pour les sols présentant un pH supérieur à 7 pour les 2 pathogènes. Les résultats obtenus vont permettre de modéliser la survie de ces pathogènes dans les sols en fonction de paramètres pédo-climatiques et donc à terme de mieux gérer les épandages de PRO en fonction des types de sols pour limiter la persistance de pathogènes dans les sols.

**Mots clés :** *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, incidence, survie, sol, paramètres physico-chimiques, microflore

**Abstract:** Soil contamination by bacterial pathogens can occur through manure, sewage sludge spreading or irrigation using waste water treatment plants effluents. Agricultural soils may act as reservoirs for these pathogens, play a significant role in their dissemination, leading to the potential contamination of food and water resources. Health risk associated with the occurrence of pathogens in environmental matrices has to be thoroughly evaluated. In this context, the objectives of this work were: i) to determine the prevalence of two pathogenic bacterial species (*Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis*) in a large collection of French soils originated from a systematic soil survey of the territory, called RMQS (16x16 km grid), ii) to determine major biotic and abiotic parameters driving the survival of bacterial pathogens in soils. Two approaches were used to reach these objectives: i) the prevalence of the two pathogens was monitored in 1200 soils using specific molecular detection tools (real time PCR using TaqMan probe detection system) and ii) the survival of the 2 pathogens, inoculated in soil microcosms, was determined over a 84 days incubation period under laboratory conditions, on a subset of 100 soils from the RMQS survey, using classical microbiological methods. *L. monocytogenes* was not detected in the set of 1200 soils (with a detection limit estimated to be  $10^4$  bacteria per gram of soil) using the molecular detection method, while *E. faecalis* was detected in approximately 4% of the soils tested (on a smaller set of 150 RMQS soils). The two bacterial pathogens were able to survive in the majority of soil, although *L. monocytogenes* survived in a greater number of soils. Soils where both pathogens survived represented 44% of soils. The survival of both pathogens is strongly impaired in sandy acidic soils. However, textural and chemical parameters driving survival of the two pathogens differed: *L. monocytogenes* survival is increased in soils with higher BCSR (basic cation saturation ration) and CEC (cation exchange capacity). *L. monocytogenes* long-term survival is favored by higher soil clay content. *E. faecalis* survival is impaired in soils with high total Ca content (calcareous soils). Soil microflora inhibits survival of both pathogens especially in soil with alkaline pH's. The results of our study will allow implementing survival models for these two pathogens. Such data is invaluable for a better and safer management of soil manuring using various organic residues.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, prevalence, survival, sol, biotic parameters, abiotic parameters, microbial communities